UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Avaliação da interação entre os polimorfismos da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos a mercúrio.”

Kátia Cristina de Marco

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Avaliação da interação entre os polimorfismos da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos a mercúrio.”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Kátia Cristina de Marco
Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

deMarco, Kátia Cristina

Avaliação da interação entre os polimorfismos da Óxido Nítrico sintase Endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos a mercúrio. Ribeirão Preto, 2010.

63 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior

1- Mercúrio; 2- Óxido nítrico; 3- polimorfismos genéticos; 4- Óxido Nítrico sintase Endotelial (eNOS); 5- Doenças cardiovasculares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kátia Cristina de Marco

Avaliação da interação entre os polimorfismos da Óxido Nítrico sintase Endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos a mercúrio

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de doutora em Ciências
Área de concentração: Toxicologia
Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição_____
Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____
Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____
Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____
Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____
Julgamento_____ Assinatura_____

SUMÁRIO

Resumo I

Abstract III

Lista de figuras V

Lista de tabelas VII

Lista de abreviaturas VIII

1. Introdução

1.1 O mercúrio na região amazônica 1

1.2 Efeitos tóxicos do mercúrio e o sistema cardiovascular 3

1.3 Óxido nítrico: importância para o sistema cardiovascular 5

1.4 Polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) 6

2. Hipótese 10

3. Objetivo 11

4. Materiais e métodos

4.1 Seleção dos voluntários 12

4.2 Coleta das amostras de sangue 13

4.3 Reagentes e soluções 14

4.4 Determinação de Hg no sangue 14

4.5 Determinação de nitrito plasmático 15

4.6 Extração do DNA genômico 16

4.7 Genotipagem dos polimorfismos do gene que codifica a eNOS 16

4.7.1 Região promotora ($T^{-786}C$) 16

4.7.2 Íntron 4 (27-pb VNTR) 18

4.7.3 Éxon 7 ($Glu^{298}Asp$) 18

4.8 Estimativa da frequência dos haplótipos 20

4.9 Análise estatística 21

5. Resultados 22

6. Discussão 38

7. Conclusões 46

8. Referências bibliográficas 47

Anexos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de Vasodilatação através da via NO/GMPc. 6
Figura 2 – Esquema do gene da eNOS humana e os polimorfismos estudados. 8
Figura 3 - Mapa da área de estudo. 13
Figura 4- Esquema de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). 15
Figua 5 – Esquema ilustrativo do analisador de NO. 16
Figura 6 – Ilustração da genotipagem para o polimorfismo $T^{-786}C$ na região promotora, no íntron 4 (27-pb VNTR) e do polimorfismo $Glu^{298}Asp$ no éxon 7 do gene que codifica a eNOS. 20
Figura 7 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo da região promotora ($T^{-786}C$) do gene que codifica a eNOS. 27
Figura 8 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo 27-pb VNTR no íntron 4 do gene que codifica a eNOS. 28
Figura 9 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo $Glu^{298}Asp$ (G >T) no éxon 7 do gene que codifica a eNOS. 29
Figura 10 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo TT e no grupo com genótipos TC+CC, com concentração de Hg abaixo e acima da mediana. 31
Figura 11 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo 4b4b e no grupo com genótipos 4a4a+4a4b, com concentração de Hg abaixo e acima da mediana, respectivamente. 32
Figura 12 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de 33

voluntários com genótipo GG e no grupo com genótipos TT+GT, com concentração de Hg abaixo e acima da mediana.

Figura 13 - Concentração plasmática de nitrito nos voluntários agrupados de acordo com a análise haplotípica. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo na região promotora ($T^{-786}C$) do gene que codifica a eNOS. 23

Tabela 2. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo no íntron 4 (27-pb VNTR) do gene que codifica a eNOS. 24

Tabela 3. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo no éxon 7 ($Glu^{298}Asp$) do gene que codifica a eNOS. 25

Tabela 4 - Estimativa da freqüência dos haplótipos na população estudada e de outras populações. 35

LISTA DE ABREVIATURAS

Hg – mercúrio;

Hg^o – mercúrio metálico ou elementar;

i-Hg – mercúrio inorgânico;

o-Hg – mercúrio orgânico;

MeHg – metilmercúrio;

DCV – doenças cardiovasculares;

SNC – sistema nervoso central;

NO – óxido nítrico;

NOS – óxido nítrico sintase;

eNOS ou NOSIII – óxido nítrico sintase endotelial;

iNOS ou NOSII – óxido nítrico sintase induzida;

nNOS ou NOSI – óxido nítrico sintase neuronal;

GCs – guanilato ciclase solúvel;

GMPc – guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico;

$O^{\cdot -}_2$ - superóxido;

$ONOO^-$ - peróxinitrito;

NO^-_2- nitrito;

NO^-_3- nitrato;

GTP - guanosina trifosfato;

PDE - fosfodiesterase;

GMP - guanosina monofosfato;

PKG - proteína quinase G;

SNP – substituição de simples troca de nucleotídeo;

VNTR – variações no número de sequências repetidas;

DNA – ácido desoxirribonucléico;

RNA – ácido ribonucléico;

NIST – National Institute of Standards and Technology;

ICP-MS – espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente;

PCR – reação em cadeia da polimerase;

RESUMO

deMarco, K. C. **Avaliação da interação entre os polimorfismos da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos à mercúrio.** 2010. 63 f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2010.

Há décadas a exposição ao mercúrio (Hg) é alvo de estudos toxicológicos devido ao alto potencial de danos a saúde humana. Na região amazônica os primeiros estudos reportavam a exposição ocupacional pelo uso nos garimpos de ouro, entretanto recentemente destacam-se os estudos relacionados a exposição ambiental que ocorre na região decorrente do consumo de peixes contaminados com mercúrio. Muitos estudos se concentram em populações ribeirinhas residentes na região do rio Tapajós, onde o consumo de peixes é frequente e o metilmercúrio (MeHg) contido nestes peixes é o responsável pela exposição dessas pessoas ao metal. O MeHg apresenta efeitos tóxicos relevantes sobre o sistema cardiovascular, e muitos grupos de pesquisa buscam elucidar os mecanismos que expliquem tais efeitos. Alguns estudos apontam uma diminuição significativa na disponibilidade do óxido nítrico (NO) após exposição ao organometal, o que poderia contribuir para uma alteração da fisiologia cardiovascular uma vez que o NO é um modulador desse sistema. O NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e sua atividade pode ser alterada por vários fatores, dentre eles, os polimorfismos nos genes que codificam essa proteína, são eles: $T^{-786}C$ na região promotora, 27-pb VNTR no íntron 4 e $Glu^{298}Asp$ no éxon 7. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos dos polimorfismos da eNOS sobre a síntese de NO entre os indivíduos expostos a metilmercúrio. Foram analisadas amostras de sangue de 214 voluntários com idade entre 15 e 84 anos, dos quais 103 homens e 111 mulheres. A concentração de mercúrio no sangue (Hg sangue) variou de 1,7 a 179,3 µg/L e a concentração plasmática de nitrito variou entre 85,7 e 695,8 ηM. Foram determinados os valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), índice de massa corporal (IMC) e frequência cardíaca (FC) de todos os voluntários. A PAS média foi de 119,8 mmHg e a média da PAD foi 71,8 mmHg. O IMC médio foi de 24,5 Kg/m^2 e a FC média foi 70,4 batimentos por minuto (bpm). Não foram observadas diferenças entre os grupos, segundo genótipos dos três polimorfismos, quanto às características dos voluntários: idade, PAS, PAD, IMC, FC, Hg sangue e as concentrações plasmáticas de nitrito. Quando os polimorfismos foram estudados isoladamente foi observado que o alelo C na região promotora, o alelo 4b no íntron 4 e o alelo G no éxon 7 apresentaram-se associados a concentrações reduzidas e nitrito plasmático. Quando a população foi estratificada com base na concentração de Hg essa associação desapareceu, provavelmente mascarada pelas altas concentrações do metal. Entretanto, quando foram estudados os haplótipos, combinação dos três polimorfismos, pôde ser observada novamente a associação desses mesmos alelos com a diminuição da concentração do nitrito, confirmando os achados iniciais. O haplótipo mais frequente na população combina os alelos selvagens para todos

os polimorfismos (T, 4b e G) e o haplótipo menos frequente combina os alelos variantes. O haplótipo associado à menor concentração plasmática de nitrito combina os alelos (C, 4a e G), confirmando os primeiros resultados. Essa abordagem haplotípica é muito útil na observação de efeitos mais discretos uma vez que é possível observar os efeitos dos três polimorfismos agindo simultaneamente sobre uma variável, nesse caso o óxido nítrico. O presente estudo sugere que os fatores genéticos exercem grande influência sobre a produção e biodisponibilidade de NO e que esses fatores combinados com a exposição ambiental ao Hg podem agir de maneira sinérgica, aumentando a suscetibilidade aos efeitos cardiotóxicos do metal através da modulação da atividade da eNOS.

Palavras-chave: metilmercúrio, óxido nítrico, polimorfismos genéticos, óxido nítrico sintase endotelial, doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

deMarco, K. C. **Evaluation of the interaction between endothelial nitric oxide synthase polymorphism and the systemic nitric oxide bioavailability in mercury exposed subjects.** 2010. 63f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2010.

The mercury (Hg) exposure has been target of toxicological studies due the high potential of damage to human health. In the Amazon region the first studies reported the occupational exposure due the use in gold mining, however, recently become relevant the studies about the environment exposure due the fish intake in the riparian population. Several studies have been concentrated in the riparian community in the Tapajós river region, where the fish consumption is frequent and the methylmercury content in fish is responsible to exposure of this people. The MeHg presents toxic effects in the cardiovascular system and many researches groups try to elucidate the mechanisms that explain this effects. Some studies report a significant reducing in nitric oxide (NO) production after the Hg exposure, which could contribute to an altered physiology of the cardiovascular system, once the NO is a modulating factor of this system. The NO is produced by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its activity can be altered by many factors like polymorphisms in gene that codify this protein, among this: : $T^{-786}C$ in the promoter region, 27-pb VNTR in intron 4 and $Glu^{298}Asp$ in exon 7. In this regard, the present study mean to evaluate the effects of the eNOS polymorphisms over the NO synthesis among the Hg exposed subjects. In this work, the whole blood samples of 214 volunteers were analyzed for determination of Hg concentration, nitrite plasma concentration and genotyping. The age of the volunteers varied between 15 and 84 years old, including 103 men and 111 women. The blood mercury concentration varied between 1.7 and 179.3 µg/L and the nitrite plasma concentration varied between 85.7 and 695.8 ηM. Was determinate the systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), body mass index (BMI) and heart rate (HR). The SAP mean was 119.8 mmHg and the DAP mean was 71.8 mmHg. The BMI mean was 24.5 Kg/m^2 and the HR mean was 70.4 beats per minute. There was no difference among the groups of the three polymorphisms according the volunteers characteristics: age, DAP, SAP, BMI, HR, blood Hg concentration and nitrite plasma concentration. When the polymorphisms were observed separately the reduced nitrite plasma concentration was associated with the presence of the alleles: C in promoter region, 4b in intron 4 and G in exon 7, however there is lack of association when the volunteers were grouped according the blood Hg concentration, probably due a mask effect of the high Hg concentration. When these three polymorphisms were observed simultaneously, in analysis of the haplotypes, the association between the same alleles and the nitrite plasma concentration was observed again, confirming the initial findings. The commonest haplotype in the volunteers combine the alleles of the three polymorphisms (T, 4b and G) and the less frequent haplotype combine the three variants alleles. There was an association between the haplotype C, 4b and G and reduced nitrite plasma concentration, according the result of the polymorphisms separately. The haplotype analysis is too interesting to observe discrete effects, once is possible to analyze the effects of the three polymorphisms acting simultaneously above one variable, in this case, nitric oxide production. The present study suggest that genetic factors could exert a relevant influence above the

NO production and bioavailability and that this factors combined with environmental Hg exposure can acting synergic, increasing the susceptibility to Hg cardiovascular effects, through the modulation of the eNOS activity.

Keywords: methylmercury, nitric oxide, genetic polymorphisms, endothelial nitric oxide synthase, cardiovascular diseases.

INTRODUÇÃO

O mercúrio na região amazônica

Mercúrio (Hg) é um metal não essencial, encontrado nas formas químicas de mercúrio metálico ou elementar (Hg^o), mercúrio inorgânico (i-Hg) e mercúrio orgânico (o-Hg).

A emissão de vapores de mercúrio para o ambiente ocorre por duas fontes distintas: uma fonte natural, como no caso dos vulcões, e também de fontes antropogênicas, ou seja, provenientes das indústrias, incineração municipal, do uso no garimpo, entre outros (FITZGERALD; CLARKSON, 1991; CLARKSON, 2002).

Os vapores de mercúrio são estáveis e podem residir na atmosfera por até um ano, se distribuindo até regiões mais remotas. Lentamente esse mercúrio metálico é captado pela vegetação e incorporado ao solo, ou oxidado na atmosfera, gerando íons de mercúrio que retornam aos solos, rios e lagos, trazidos pelas chuvas (CLARKSON, 2002; DOREA; BARBOSA; SILVA, 2006).

Há vários anos a região amazônica é alvo de estudos sobre a exposição ao mercúrio, inicialmente devido à exposição ocupacional que ocorria nos garimpos de ouro, pela inalação de vapores e mais recentemente relacionados à exposição ambiental como consequência da expansão do processo de desmatamento, seja para cultivo de lavouras ou comercialização de madeira. Essa intervenção humana passou a mobilizar o mercúrio contido nos solos e protegido pelas florestas, de tal forma que esse metal tóxico passou a ser levado para dentro de rios e lagos sob ação das chuvas e do processo de erosão. Uma vez no ambiente aquático, o Hg se deposita nos sedimentos onde microrganismos residentes modificam sua forma química através de uma reação de metilação, gerando metilmercúrio (MeHg), a espécie mais importante em termos de toxicidade e efeitos danosos á saúde humana (ATSDR, 1999; DOREA; BARBOSA; SILVA, 2006).

Como consequência, peixes provenientes desse meio acumulam MeHg tornando-se a principal fonte de exposição ambiental para o homem (BARBOSA et al, 2003; DOREA; BARBOSA; SILVA, 2006; BELIVEAU et al, 2009).

Quase 100% do mercúrio encontrado nos peixes está na forma de MeHg (CABANERO; MADRID; CAMARA, 2007), uma forma química com alta lipossolubilidade, que atravessa facilmente as membranas biológicas, podendo se depositar e permanecer por longos períodos nos tecidos humanos (CASTOLDI; COCCINI; MANZO, 2003).

Após a ingestão, 95% do MeHg é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, alcançando a corrente sanguínea onde se liga a grupos sulfidrilas das proteínas eritrocitárias e se distribui para os tecidos. O MeHg é eliminado pelas fezes mas para que isso ocorra ele deve ser metabolizado e transformado em mercúrio inorgânico, um processo lento que resulta em uma meia-vida biológica da ordem de 50 dias, e contribui para que ele se acumule no organismo em situações de exposição crônica (CLARKSON, 2002), como nos casos de ingestão de peixes contaminados.

A cadeia alimentar tem enorme influência sobre as concentrações de MeHg nos peixes devido a sua característica cumulativa, ou seja, peixes carnívoros maiores, que se alimentam de outros peixes, acumulam muito mais o organometal que peixes menores herbívoros. Assim a contaminação das pessoas depende não só da quantidade, mas também da qualidade dos peixes que são consumidos (MOZAFFARIAN; RIMM, 2006).

Na região amazônica, especialmente nas áreas próximas ao rio Tapajós (Pará-Brasil), é comum encontrar pessoas vivendo em comunidades ribeirinhas isoladas onde a principal fonte de proteína na alimentação é proveniente do no consumo de peixes e com isso se tornam mais suscetíveis a exposição ao MeHg.

Estudos realizados na região amazônica reportam concentrações elevadas de mercúrio nos peixes e na população, e uma significativa relação entre o consumo de peixes e os biomarcadores de exposição ao mercúrio (MALM et al, 1995; DOLBEC et al, 2001; PASSOS; MERGLER, 2008).

Em estudo realizado na região do rio Tapajós em 2001, pesquisadores mostraram que as concentrações de mercúrio no cabelo da população ribeirinha, especificamente nas comunidades próximas a cidade de Itaituba, estiveram em média em 14,1 µg/g, com valores encontrados de até 62,9 µg/g (HARADA et al, 2001). Em geral, em população não exposta, as concentrações de mercúrio no cabelo e no sangue são inferiores a 5,0 µg/g e 5 µg/L, respectivamente (MURATA; BUDTZ-JØRGENSEN; GRANDJEAN, 2002).

Em 2006, outro estudo realizado na mesma região do rio Tapajós envolvendo 236 voluntários de comunidades ribeirinhas reportou concentração de Hg no sangue com média de 61,8 µg/L, com valores variando de 4,8 a 223,7 µg/L (LEMIRE et al, 2006).

Em 2003, Passos et al realizou um estudo com 26 mulheres da comunidade de Brasília Legal (rio Tapajós) e mostrou que essas voluntárias apresentavam, em média, a concentração de 10 µg/g de Hg em amostras de cabelo, com variação de 4 a 20 µg/g, sendo que, em média, 96% do Hg quantificado estava na forma de MeHg (PASSOS et al, 2003). Em 2007, o mesmo grupo de pesquisa realizou um novo estudo mais abrangente com a população de 13 comunidades ribeirinhas ao longo do rio Tapajós e reportou concentração média de Hg no sangue de 57,1 µg/L com valores variando de 4,8 a 205,4 µg/L e concentração média de Hg em amostras de cabelo de 16,8 µg/L com valore de até 58,3 µg/L. Este trabalho mostrou ainda que, em média, 87% do Hg presente no sangue estava na forma de MeHg, em algumas amostras chegando a alcançar 94% da forma orgânica do metal (PASSOS et al, 2007)

Efeitos tóxicos do Mercúrio e o Sistema Cardiovascular

Os efeitos tóxicos do mercúrio são distribuídos por todo o organismo humano, abrangendo o sistema gastrointestinal, renal, muscular esquelético, hepático e até o material genético (aberrações cromossômicas em fetos de mães expostas), entretanto, efeitos relevantes e mais pronunciados são observados principalmente no sistema nervoso (RACZ; VANDEWATER, 1982; WHO, 1990).

Os primeiros estudos sobre exposição ao MeHg e seus efeitos a saúde humana foram decorrentes das catástrofes ocorridas no Japão e no Iraque. Em 1956 uma grande quantidade de mercúrio foi descartada na Baia de Minamata (Japão) e contaminou os peixes que alimentavam a população local; posteriormente, em 1971 no Iraque, cerca de 6 mil pessoas foram expostas decorrente do uso do mercúrio como antifúngico para grãos.

Esses dois eventos resultaram em vários óbitos e populações com sequelas neurológicas debilitantes como retardo mental e paralisia cerebral conhecidas como “Doença de Minamata” (BAKIR et al, 1973; INSKIP; PIOTROWSKI, 1985).

Estudos mostram que o MeHg apresenta efeitos neurotóxicos com a capacidade de induzir sérios danos no desenvolvimento neurológico e até mesmo desordens semelhantes ao autismo (GEIER; GEIER, 2003). A parestesia é o primeiro sinal que ocorre após exposição ao MeHg, seguida de outros sintomas como ataxia (falta de coordenação dos movimentos), disartria (dificuldade de falar), comprometimento da visão e da audição. Esses sinais e sintomas são causados por

danos nas células neuronais em regiões específicas do cérebro (GUZZI; LA PORTA, 2008).

Um estudo realizado em 2003 reportou que em populações expostas a baixas concentrações de MeHg os efeitos tóxicos abrangem o desenvolvimento neurológico e incluem deficiência na fala, dificuldade de aprendizagem, falta de concentração, dificuldade de realização de movimentos finos e dificuldades visuais (CASTOLDI; COCCINI; MANZO, 2003).

Um estudo conduzido em população ribeirinha na região Amazônica reportou efeitos tóxicos do MeHg no sistema motor como falta de controle dos movimentos, comprometimento dos reflexos, fraqueza e fadiga muscular bem como alterações nas áreas cerebrais relacionadas a visão com consequente restrição do campo visual e diminuição da visão (LEBEL et al, 1996, 1998)

Recentemente o sistema cardiovascular tomou destaque entre os sistemas afetados pela exposição ao mercúrio, uma vez que os sintomas geralmente são sub-clínicos, dificultando uma intervenção preventiva ou terapêutica e se tornando um risco potencial (CHAN; EGELAND, 2004; STERN, 2005; PASSOS; MERGLER, 2008). Estudos reportaram associação entre a exposição ao mercúrio e aumento do risco de infarto do miocárdio, doenças coronarianas, progressão de processos ateroscleróticos, dentre outras doenças cardiovasculares (DCV) (SALONEN et al, 1995; SALONEN, 1998; SALONEN et al, 2000; VIRTANEN et al, 2007; CHOI et al, 2009; MOZAFFARIAN, 2009).

Neste sentido, torna-se cada vez maior o interesse sobre a relação entre as concentrações de mercúrio em marcadores biológicos de exposição e o aumento ao risco a doenças cardiovasculares, uma vez que essas são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade.

Apesar de vários estudos relacionando a exposição ao mercúrio e danos no sistema cardiovascular, pouco é conhecido sobre o mecanismo pelo qual tais efeitos ocorrem. Alguns estudos indicam a alteração na síntese e biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) como um mecanismo relevante (POREBSKA, 2008). Kishimoto et al. (1995) usaram amostras de células humanas do endotélio vascular umbilical e observaram que a exposição dessas células ao mercúrio provocou uma diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase e consequente redução na síntese do óxido nítrico. Em estudo mais recente, Kuo et al. (2002) usando amostra de

neutrófilos isolados de rato, também demonstraram ocorrer uma diminuição na síntese de óxido nítrico, quando do tratamento com metilmercúrio.

Óxido nítrico: importância para o sistema cardiovascular

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pela reação de conversão da L-Arginina em L-citrulina através da atividade catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS), presente em vários tecidos (MAYER; HEMMENS, 1997). Existem três isoformas conhecidas desta enzima: neuronal (nNOS ou NOSI), induzida (iNOS ou NOSII) e endotelial (eNOS ou NOSIII). Todas estas isoformas são expressas no sistema cardiovascular, entretanto a eNOS, encontrada principalmente nas células endoteliais e plaquetas, é a de maior importância na manutenção desse sistema. O NO sintetizado a partir do endotélio é reportado por desempenhar um papel fundamental na homeostase cardiovascular, regulando o tônus vascular, fluxo sanguíneo regional e a pressão sanguínea sistêmica, além de conferir propriedades tromborresistentes e ateroprotetoras ao endotélio (STRIJDOM; CHAMANE; LOCHNER, 2009).

Dentre as muitas funções e efeitos biológicos apresentados pelo NO, a estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs) provavelmente é a mais importante, pois a partir da ativação da GCs ocorre a produção de guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (GMPc) que é o responsável por muitos dos efeitos biológicos mediados pelo NO, como a vasodilatação (WALDMAN; MURAD, 1987). Após ser produzido no endotélio vascular, o NO não é armazenado, mas se difunde até as células musculares lisas promovendo vasodilatação, e na luz vascular reage com a oxi-hemoglobina das hemácias, transformando-se rapidamente em nitrito (biologicamente ativo), que em seguida é oxidado a nitrato, um composto biologicamente inativo (COSBY et al, 2003; WANG et al, 2004).

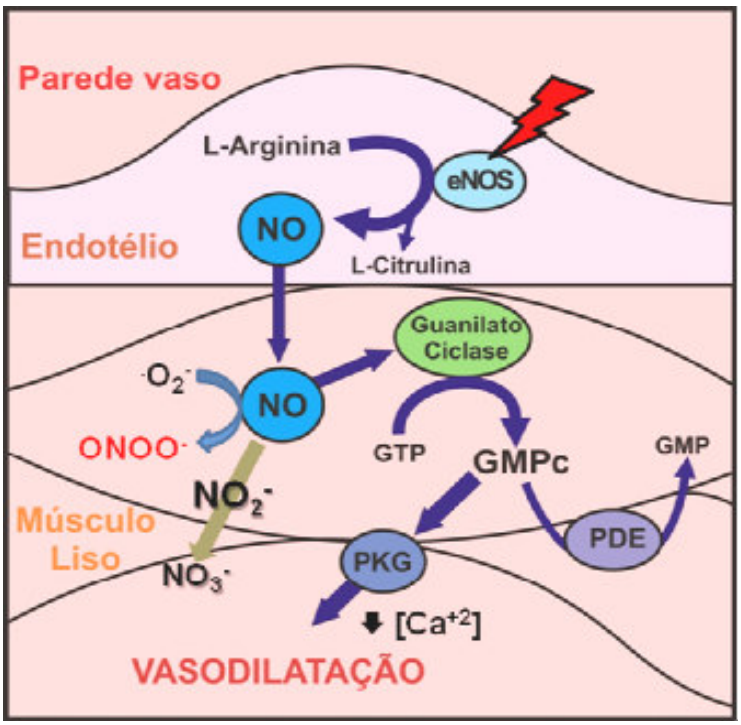


Figura 1 – Mecanismo de vasodilatação através da via NO/GMPc. (NO, Óxido Nítrico; eNOS, Óxido Nítrico Sintase Endotelial; O^{-}_2, Superóxido; ONOO-, Peróxinitrito; NO^{-}_2, Nitrito; NO^{-}_3, Nitrato; GTP, Guanosina Trifosfato; GMPc, Guanosina 3',5'-Monoosfato cíclico; PDE, Fosfodiesterase; GMP, Guanosina Monofosfato; PKG, proteína quinase G). Adaptado de: (DAVIS et al, 2001; THOMAS; ZHANG; VICTOR, 2001).

Pelo fato do NO apresentar baixa meia-vida biológica, a melhor forma de monitorar sua formação é através da quantificação de seus metabólitos, nitrito e nitrato, visto que estudos demonstraram que estes refletem a atividade da eNOS (LAUER; KLEINBONGARD; KELM, 2002; KLEINBONGARD et al, 2006). O nitrito representa um melhor marcador da produção de NO em relação ao nitrato (GLADWIN et al, 2005), além de constituir uma importante fonte de NO intravascular e cardíaco (COSBY et al, 2003; HENDGEN-COTTA et al, 2008; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Grande parte das doenças cardiovasculares é causada por disfunções endoteliais, intimamente ligadas a alterações na produção do NO, que é regulada através de alterações na expressão ou atividade da eNOS (CHARLES et al, 1996). Conhecida a relevância do óxido nítrico nesse sistema, iniciou-se a procura por

variações (polimorfismos) no gene que codifica a eNOS que pudessem, ao menos em parte, explicar a ocorrência de diferentes níveis de atividade e/ou expressão desta enzima e, possivelmente, um maior risco de doença cardiovascular aos portadores destas variações genéticas (WANG; WANG, 2000; HINGORANI, 2001, 2003).

O gene que codifica a eNOS está localizado no cromossomo 7q35-36, possui 21 Kb e contém 26 éxons (FLEMING; BUSSE, 2003). Cada pessoa possui duas cópias de todos os genes (com exceção daqueles ligados ao sexo), porém os indivíduos podem ter diferenças na sequência de DNA em determinados *loci* (posições) dos cromossomos. Variações que ocorrem na população de forma estável com frequência igual ou superior a 1% são denominadas de polimorfismos. As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, mutações, substituições de simples troca de nucleotídeo (SNP) e de variações no número de sequências repetidas (VNTR). Estas variações, por alterarem bases de DNA, podem provocar modificações em várias etapas biológicas, como na transcrição gênica e na tradução e *splicing* do RNA.

Os SNPs localizados na região promotora do gene podem alterar a ligação de um fator de transcrição, e assim regular, inibindo ou ativando, a transcrição gênica (GRIFFITHS et al, 2002).

Ademais, a presença de SNPs em regiões do gene que acarretam a troca de um aminoácido por outro (*non synonimous*), pode alterar a função, concentração, afinidade pelo substrato e/ou atividade de proteína. Os polimorfismos presentes em íntrons podem alterar o modo como o RNA mensageiro será clivado, eliminado os íntrons e reunindo os éxons.

Todos esses fatores descritos tornam o estudo de polimorfismos genéticos uma área muito promissora e com grandes possibilidades de aplicação clínica.

Atualmente são conhecidos mais de 20 polimorfismos no gene da eNOS. Entretanto três deles vêm sendo mais estudados por apresentarem uma possível relevância clínica (Figura 2). São eles:

• Um SNP denominado $T^{-786}C$ caracterizado pela presença de uma timina (variante mais comum) ou uma citosina (variante mais raro) na posição –786 do gene, portanto na região promotora;

• Um VNTR localizado no íntron 4, com 4 ou 5 repetições de uma sequência de 27 pb. O variante 4x também é conhecido como variante “a” (variante mais raro) e o variante 5x como “b” (mais comum);

• Um SNP denominado $Glu^{298}Asp$ localizado no éxon 7, caracterizado pela presença de uma guanina (G - mais comum) ou uma timina (T - mais raro) no nucleotídeo 894. A presença da G ou de T acarreta mudança do aminoácido Glutamato por Aspartato na posição 298 ($Glu^{298}Asp$) da proteína eNOS.

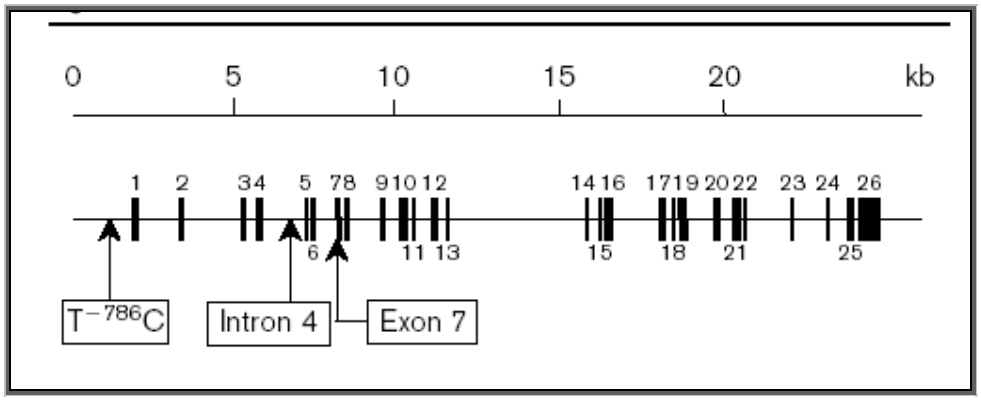


Figura 2 – Esquema do gene da eNOS humana e os polimorfismos estudados. Extraído de (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART, 2001).

Vários estudos buscam explicar os possíveis mecanismos pelos quais essas variações genéticas podem afetar a atividade da eNOS. Estudos in vitro indicam que a presença do alelo C, do polimorfismo $T^{-786}C$ que ocorre na região promotora, reduz em cerca de 50% a atividade do promotor, assim como os níveis celulares de RNA mensageiro e consequentemente a produção de óxido nítrico (NAKAYAMA et al, 1999).

O alelo variante Asp do polimorfismo $Glu^{298}Asp$ que ocorre no éxon 7, foi associado à redução da resposta enzimática frente ao estímulo de estresse (JOSHI; BAUER, 2008).

No polimorfismo presente no íntron 4, a presença do alelo 4a foi associada a um aumento em mais de 4 vezes na atividade enzimática da eNOS e um aumento significativo na quantidade de mRNA e proteína (WANG et al, 2000). Este polimorfismo pode funcionar como um potencial regulador da transcrição do gene da eNOS. Em outro estudo com o mesmo polimorfismo foi demonstrado que os alelos deste polimorfismo são associados às diferenças na formação de pequenos RNA

capazes de suprimir especificamente a expressão do gene da eNOS (ZHANG et al, 2008).

Vários grupos estudam a associação destas variantes com doenças cardiovasculares: doenças da artéria coronária (HINGORANI et al, 1999; ARAS et al, 2002), infarto do miocárdio (SHIMASAKI et al, 1998; NAKAYAMA et al, 2000), espasmos da artéria coronária (YOSHIMURA et al, 1998, 2000) e hipertensão (ORMEZZANO et al, 2007; MARSON, 2008; SANDRIM et al, 2008; SRIVASTAVA et al, 2008).

No sentido de complementar o estudo individual das variações genéticas do gene que codifica a eNOS, torna-se de grande interesse o estudo dos haplótipos, ou seja, a busca por "combinação de alelos de polimorfismos em um mesmo gene" que provavelmente estejam associados, por exemplo, à síntese de NO e subsequentemente à doenças cardiovasculares. A análise haplotípica é um método muito útil não somente para a identificação de genes relacionados a doenças raras, mas também de doenças comuns, apresentando, frequentemente, maior poder de detecção de pequenas diferenças, em comparação com a análise feita utilizando somente um único polimorfismo (JOHNSON et al, 2001; ZHAO; PFEIFFER; GAIL, 2003).

Neste contexto, a exposição ao mercúrio e a presença de determinado polimorfismo genético ou haplótipo, podem agir de maneira sinérgica, promovendo uma redução na produção e biodisponibilidade de óxido nítrico, aumentando o risco de doenças cardiovasculares em determinados grupo de pessoas.

HIPÓTESE

A região amazônica é alvo de muitos estudos devido à alta exposição ao metilmercúrio que ocorre através do consumo de peixes contaminados, principalmente por populações ribeirinhas, e vários trabalhos mostram que a exposição a esse metal está associada com risco aumentado de doenças no sistema cardiovascular. Um mecanismo da ação cardiotóxica do Hg é a diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase, enzima responsável pela síntese do óxido nítrico, o qual tem papel fundamental na homeostase do sistema cardiovascular. Estudos reportam que variações genéticas no gene que codifica a eNOS podem aumentar a suscetibilidade a doenças cardiovasculares.

Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que a biodisponibilidade de óxido nítrico possa ser modulada pelas variações genéticas no gene da eNOS (polimorfismos e haplótipos) de forma a alterar a suscetibilidade aos efeitos tóxicos do mercúrio em uma população exposta pelo consumo de peixes.

OBJETIVO

Verificar se as variações genéticas no gene da eNOS (genótipos e haplótipos, associando os três polimorfismos: $T^{-786}C$, Intron 4 e $Glu^{298}Asp$) afetam a biodisponibilidade de óxido nítrico em indivíduos expostos a mercúrio pelo consumo de peixe.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos voluntários

A população estudada foi composta por voluntários residentes em 7 comunidades ribeirinhas localizadas ao longo do Rio Tapajós, no estado do Pará (Figura 3). Foram coletadas amostras de 214 voluntários (103 homens e 111 mulheres) entre 15 e 84 anos. A aprovação do estudo foi concedida pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (sob o número 0007.0.212.000-06). As pessoas que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Foi distribuído um questionário contendo questões sobre variáveis como: idade, sexo, peso, medicamentos usados que pudessem interferir nas quantificações de nitrito plasmático, informações sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares como tabagismo, hipertensão e hábitos alimentares, e tempo de residência no local para conhecimento do tempo de exposição. Foi aferida pressão arterial de todos os voluntários antes e depois de entrevista e também verificados os batimentos cardíacos.

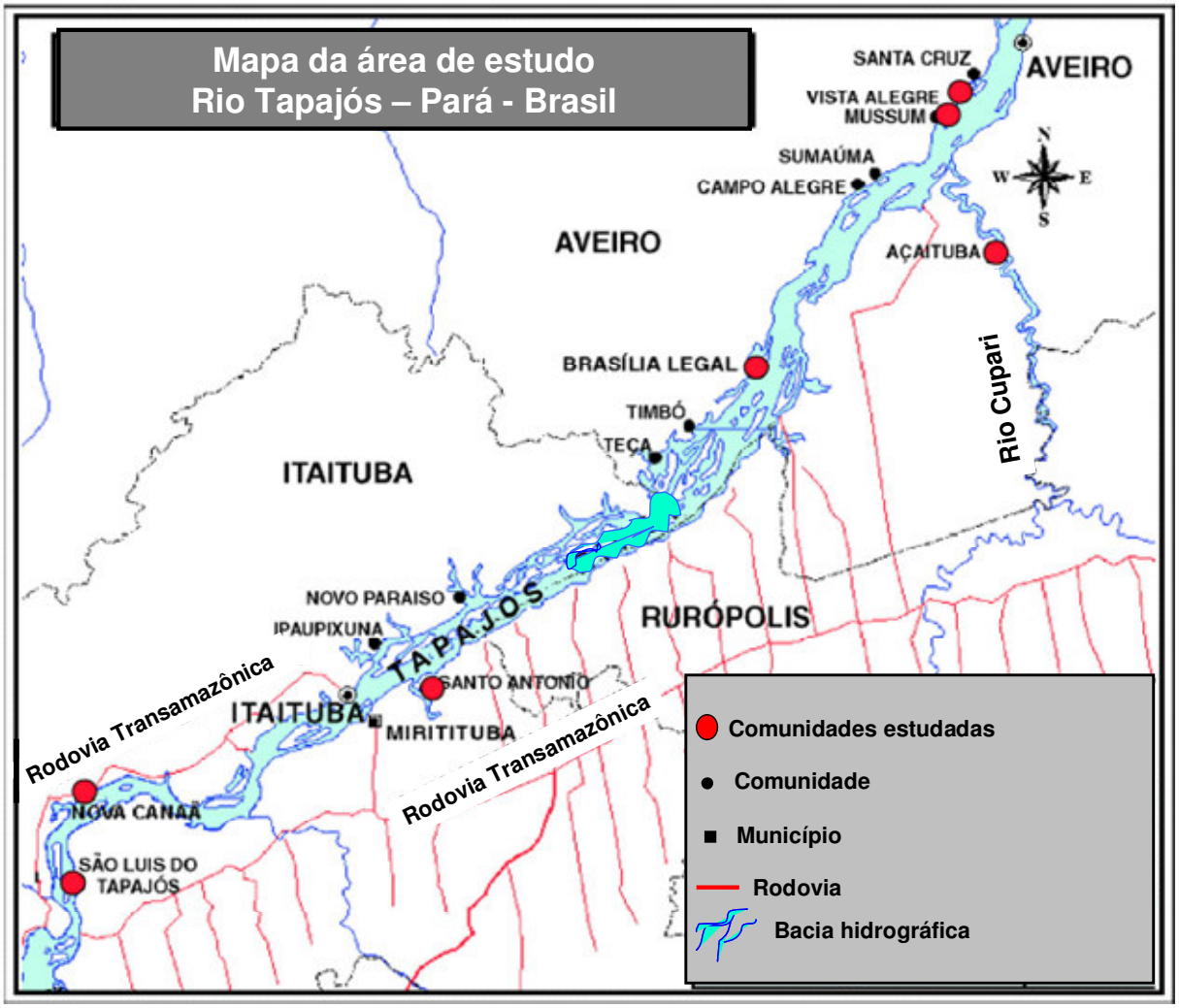


Figura 3 - Mapa da área de estudo, comunidades participantes estão identificadas com os pontos vermelhos.

Coleta da amostras de sangue

Foram coletados 6 mL de sangue venoso de cada participante. Esse volume total foi separado da seguinte maneira: (a) 1 mL para extração de DNA para genotipagem, (b) 1 mL foi utilizado para determinação das concentrações de Hg em sangue total e (c) 4 mL de sangue foram centrifugados para obtenção do plasma e posterior quantificação do nitrito plasmático. As amostras foram coletadas em tubos livres de metais (BD Vacutainer®) utilizando heparina como anticoagulante, todas as amostras foram armazenadas a -20˚C até as análises.

Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®), previamente purificada em sistema de osmose reversa (RiOs-DITM da Millipore®); ácido nítrico 65% v/v (Synth®) purificado por destilação em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo da Kürner Analysentechnik para eliminação de impurezas. Todos os reagentes utilizados foram de pureza de grau analítico.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno previamente descontaminados em solução contendo HNO3 20% v/v por 24 h, enxaguados cinco vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar (classe 100), onde também foram preparados os reagentes, amostras, soluções padrão e brancos. Todas as operações para preparo das soluções de referência de mercúrio e de metilmercúrio foram realizadas em sala limpa classe 10000.

Determinação de Hg no sangue total

As análises foram feitas em um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente(ICP-MS) modelo ELAN DRC II (PerkinElmer®, USA) (Figura 4) e autoamostrador (AS93 plus PerkinElmer®), ligado a um computador Dell Pentium 4 com o software ELAN versão 3.4. Esse equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em uma sala limpa classe 1000.

Para o preparo das soluções de calibração foi utilizada solução estoque produzida pela PerkinElmer e padronizadas pelo National Institutes of Standards and Technology (NIST), contendo 1 g/L de mercúrio (Hg). O limite de detecção foi de 0,17 µg/L. As amostras de sangue foram diluídas 1:49 v/v com uma solução diluente contendo 0,5 % (v/v) de HNO3 10 µg/L. Foi usado Ródio (Rh) 10 µg/L como padrão interno, ouro (Au) para controlar o efeito de memória do Hg na câmara de amostragem e Triton® X-100 a 0,005 % (v/v) para impedir o entupimento do bico injetor. Foi utilizado o método proposto por Palmer et al (2006).

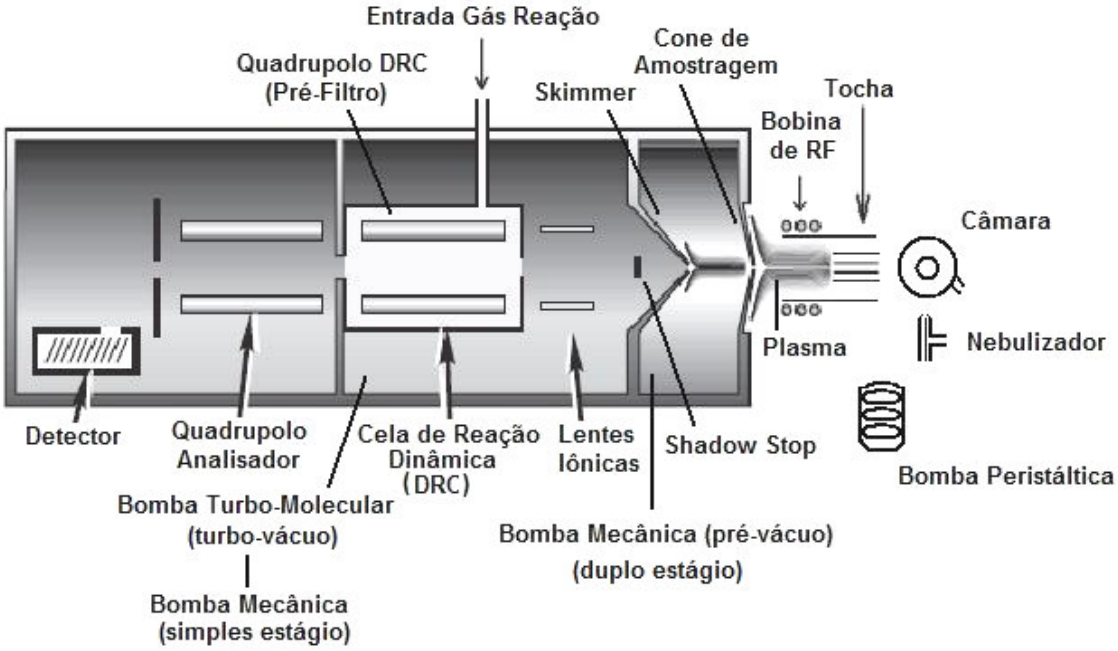


Figura 4- Esquema de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

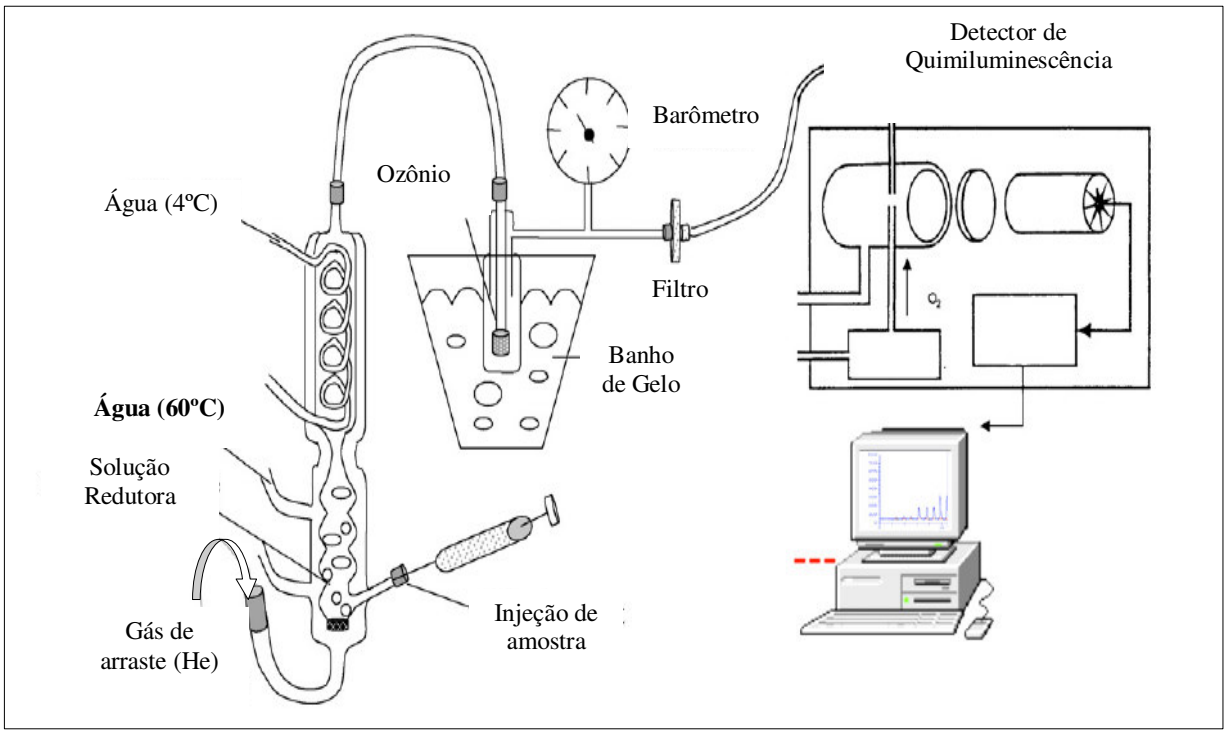
Determinação de nitrito plasmático

Para a dosagem de nitrito foi utilizada uma curva de calibração com soluções padrão de nitrito de sódio nas concentrações: 100, 200, 500 e 1000 µM. Assim como para a quantificação de nitrito, foi utilizada a mesma água (MilliQ®) usada no preparo das soluções-padrão como "branco".

As amostras de plasma foram analisadas em triplicata pelo método da quimioluminescência, o qual é simples, sensível e preciso para determinar NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), que permite determinar NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol. Foi usado o método proposto por Yang et al. (2003); Metzger et al. (2005); Nagassaki et al. (2005) e Barbosa et al. (2006).

Resumidamente, as amostras de plasma (100uL) foram injetadas num frasco contendo 8 mL de solução redutora (2,0g de iodeto de potássio e 1,3g de iodo sublimado dissolvidos em 40mL de água deionizada (MilliQ®) e 140mL de ácido acético) que converte o nitrito em NO gás. O frasco foi conectado a um fluxo contínuo de gás inerte (Hélio) que passa através da solução "carregando" o gás (NO) para uma câmara onde ocorre a reação com ozônio. Essa reação gera moléculas de NO_2 que, no seu estado excitado, emitem luz proporcionalmente às

quantidades de NO liberado pela amostra. O analisador contém um detector de luz que transformou o sinal luminoso em sinal elétrico, que foi finalmente convertido em sinal analógico e registrado (Figura 5).



Figua 5 – Esquema ilustrativo do analisador de NO (GRAU et al, 2007).

Extração do DNA genômico

A genotipagem para polimorfismos da eNOS foi feita utilizando-se DNA genômico obtido a partir de 1 mL de sangue. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o "kit" de extração de DNA "Easy-DNA" (Invitrogen®).

Genotipagem dos polimorfismos do gene que codifica a eNOS.

Região promotora (T-786C) (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART, 2001; MARRONI ET AL, 2005).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi preparada uma solução de PCR contendo, no volume final de 25 µL para 1 amostra, 6,25 pmol de cada primer (sense: 5'- TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A - 3'; antisense: 5'- GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC –3'), 200 µmol de cada

dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1,5 mM de MgCl2, 2,5 µL do tampão 10X da enzima Taq polimerase (Invitrogen®), e 5 unidades da enzima Taq polimerase e 100 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi aquecida a 94 ºC por 4 min para a desnaturação e passando por 35 ciclos de 94ºC por 30 seg., 65ºC por 30 seg. para hibridização e 72ºC por 1 min para extensão. Finalmente, para garantir a extensão, a reação permaneceu a 72ºC por mais 5 min. A amplificação resultou em fragmentos de 180 pb.

Digestão com enzima de restrição MspI

Os produtos da reação de PCR foram digeridos pela enzima de restrição MspI (Uniscience®). Cada reação foi constituída de 2 unidades da MspI, 1,0 µL do tampão da enzima 10X, 5 µL do produto de PCR e 3,5 µL de água Milli-Q®. A reação foi incubada por 6 horas a 37°C.

Separação dos produtos de digestão

Foi realizada uma eletroforese dos fragmentos obtidos na digestão, em gel de poliacrilamida a 12 % com tampão de corrida TBE, com cuba para eletroforese. A separação eletroforética foi realizada com corrente elétrica de 20 mA para cada gel (15 cm), durante 2 horas. Foi feita coloração do gel por nitrato de prata para visualização dos fragmentos de 140pb e 40pb para o alelo selvagem e de 90, 50 e 40 pb para o alelo variante (Figura 6A).

Coloração por nitrato de prata

As amostras no gel foram fixadas com solução de etanol a 10% por 5 minutos, sob agitação. Em seguida o gel foi lavado em água e depois mantido sob imersão em uma solução de ácido nítrico 1,54% por 5 minutos. Na sequência o gel foi lavado em água e imerso na solução de coloração (nitrato de prata 0,2%) por 20 minutos, também sob agitação. Finalmente o gel foi lavado em água e revelado com solução de carbonato de cálcio 3% + formaldeido 1%, mantendo-o sob agitação, até que as bandas aparecessem com uma coloração castanha bem evidente. O gel foi lavado e colocado em solução de ácido acético 5% por 5 minutos para interromper a reação.

Íntron 4 (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART, 2001; MARRONI ET AL, 2005).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi preparada uma solução de PCR contendo, no volume final de 40 µL para 1 amostra, 10 pmol de cada primer. Foram usados os seguintes primers (sense: 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT - 3'; antisense: 5'- TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC –3'), 200 µmol de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl2, 4µL do tampão 10X da enzima Taq polimerase (Invitrogen®), e 5 unidades da enzima Taq polimerase e 300 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi aquecida a 94 ºC por 4 min para a desnaturação e passando por 35 ciclos de 94ºC por 30 seg., 63ºC por 30 seg. para hibridização e 72ºC por 1 min para extensão. Finalmente, para garantir a extensão, a reação permaneceu a 72ºC por mais 5 min.

Separação dos produtos de amplificação

Após a reação de amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% com tampão de corrida TBE. A separação eletroforética dos fragmentos foi realizada com corrente elétrica de 20 mA para cada gel (15cm), durante 2h e 30 min. Foi feita coloração do gel por nitrato de prata, conforme descrito acima. A presença de fragmentos com 393 pb indicando a presença do alelo 4a (alelo variante) e com 420 pb indicando a presença do alelo 4b (alelo selvagem) (Figura 6B).

Éxon 7 (Glu298Asp) (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART, 2001; MARRONI ET AL, 2005).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi preparada uma solução de PCR contendo, no volume final de 25 µL para 1 amostra, 6,25 pmol de cada primer. Foram usados os primers (sense: 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3' e antisense: 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3'), 200 µmol de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl2, 2,5 µL do tampão 10X da enzima Taq polimerase (Invitrogen®), e 5 unidades da enzima Taq polimerase e 100 ng de DNA genômico. A reação foi aquecida a 94 ºC por 4 min para a desnaturação e passando por 35 ciclos de 94ºC por 30 seg., 63ºC por 30 seg. para hibridização e 72ºC por 1 min para extensão. Finalmente, para garantir a extensão, a reação

permaneceu a 72ºC por mais 5 min. A amplificação resultou em fragmentos de 258 pb.

Digestão com enzima de restrição BanII

Os fragmentos resultantes da amplificação foram digeridos com a enzima de restrição BanII (Uniscience®)por 12 horas a 37 ºC. A solução mix de digestão foi preparada para cada amostra, contendo, 1 unidade da BanII, 1µL do tampão da enzima 10X, 5µL do produto da amplificação e 3µL de água Milli-Q®.

Separação dos produtos de digestão

Foi realizada uma eletroforese dos fragmentos obtidos na digestão, em gel de poliacrilamida a 12 % com tampão de corrida TBE, em cuba para eletroforese. A separação foi realizada com corrente elétrica de 20 mA para cada gel (15cm), durante 2 horas. Foi feita coloração do gel por nitrato de prata, conforme descrito para a região promotora. Na presença do alelo variante “Asp” não ocorreu digestão, sendo visualizado apenas o fragmento resultante da amplificação com 258pb. Quando não há presença de variação genética (selvagem), são visualizados fragmentos de digestão de 163pb e 85pb (Figura 6C).

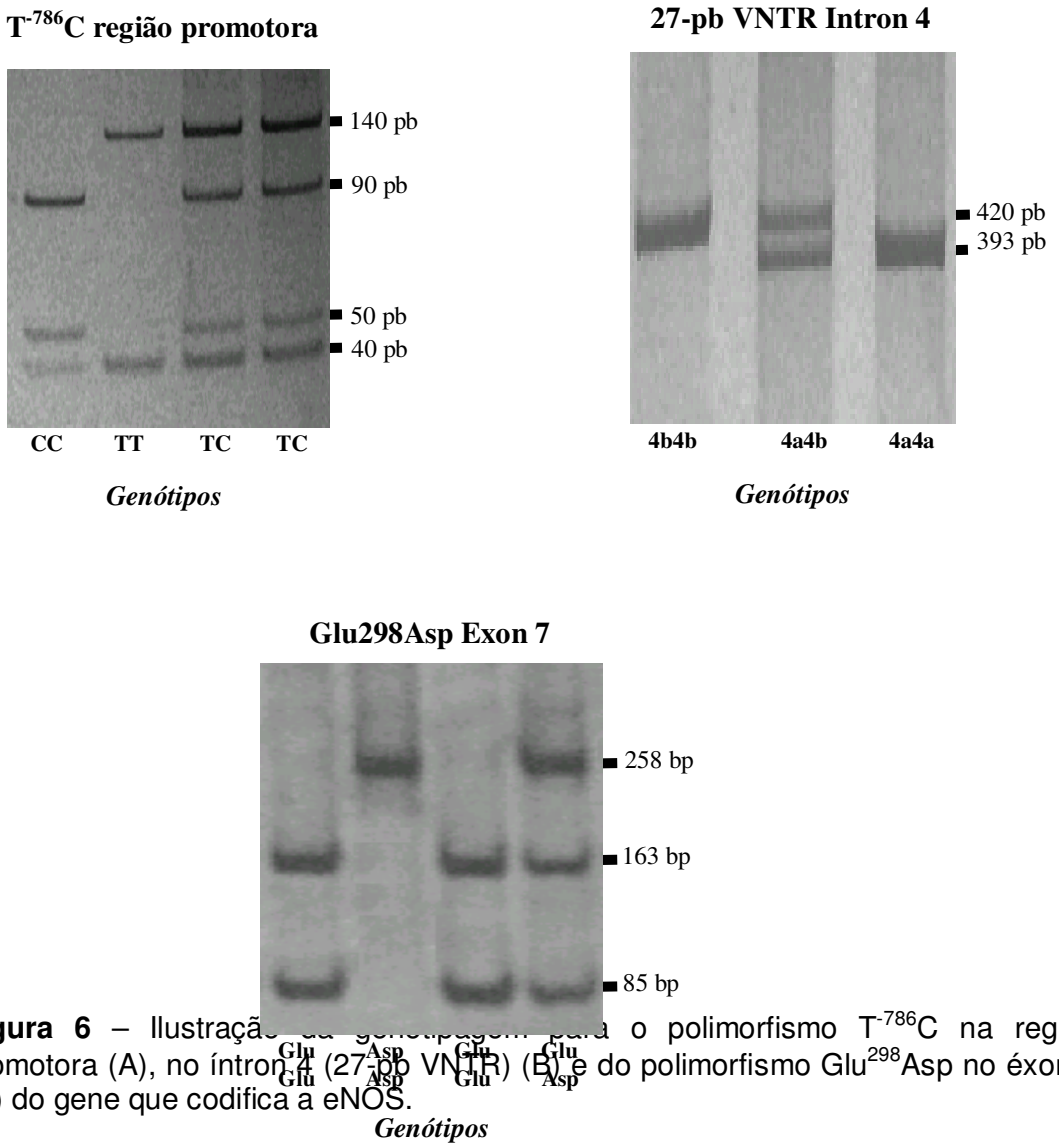


Figura 6 – Ilustração da genotipagem para o polimorfismo $T^{-786}C$ na região promotora (A), no íntron 4 (27-pb VNTR) (B) e do polimorfismo $Glu^{298}Asp$ no éxon 7 (C) do gene que codifica a eNOS.

Estimada da frequência de haplótipos

Para a construção dos possíveis haplótipos a partir dos dados sobre os três polimorfismos estudados na população ($T^{-786}C$, $Glu^{298}Asp$ e íntron 4) foi utilizado o programa PHASE versão 2.1 (disponível em www.stat.washington.edu/stephens/software.html). Para a estimativa da frequência de ocorrência de cada haplótipo na população foi usado o programa "Estimating Haplotype" (EH) (disponível em http://linkage.rockefeller.edu/ott/eh.htm) (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; STEPHENS; DONNELLY, 2003).

Para o funcionamento dos dois programas, os dados obtidos a partir das genotipagens dos três polimorfismos foram organizados em planilhas e posteriormente foram criados arquivos no bloco de notas constando o número e as características dos polimorfismos estudados, os resultados das genotipagens para cada voluntário e para cada polimorfismo estudado, bem como o numero de indivíduos participantes do estudo. Posteriormente, os programas utilizaram esses arquivos como base de dados para a construção dos possíveis haplótipos e suas respectivas freqüências na população.

Utilizamos esses resultados para investigar o possível efeito dos haplótipos sobre a biodisponibilidade de NO (concentrações plasmáticas de nitrito).

Análise estatística

Foi usada a estatística descritiva para apresentar as características gerais da população estudada. Para avaliar a associação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e as concentrações de Hg no sangue foi utilizado o teste de correlação de Pearson (rp, P), com base na distribuição normal desses dados da população. Para avaliar a contribuição de cada uma das variáveis (concentração de Hg e polimorfismos) sobre a concentração plasmática de nitrito foi utilizado o teste de Anova duas vias. A distribuição genotípica de cada polimorfismo foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste $\chi 2$. Para verificar a existência de associação entre os haplótipos com as concentrações plasmáticas de nitrito utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, tendo o teste de Dunn como pós teste. Para reduzir os graus de liberdade e aumentar o poder do teste nas análises baseadas nos haplótipos, foram incluídos na análise somente os haplótipos mais comuns na população estudada (frequência superior a 5%). Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Os resultados foram considerados como estatisticamente significantes para valores de $P<0,05$.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue de 214 voluntários com idade entre 15 e 84 anos (média 41 anos e mediana 39), dos quais 103 homens e 111 mulheres.

A concentração de mercúrio no sangue total variou de 1,7 a 179,3 µg/L, com média e desvio padrão de 50,47 µg/L e 35,22 µg/L, respectivamente.

Concentração plasmática de nitrito variou entre 85,7 e 695,8 ηM, com média e desvio padrão de 251,1 ηM e 106,5 ηM, respectivamente.

Foram determinados os valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), índice de massa corporal (IMC) e frequência cardíaca (FC) de todos os voluntários.

A pressão arterial sistólica variou entre 86,0 e 221,0 mmHg, com média e desvio padrão de 119,8 mmHg e 19,3 mmHg, respectivamente.

A pressão arterial diastólica variou de 43,3 a 114,3 mmHg, com média e desvio padrão de 71,8 mmHg e 10,6 mmHg, respectivamente.

O índice de massa corporal variou entre 16,1 e 41,5 Kg/m^2, com média e desvio padrão de 24,5 Kg/m^2 e 4,2 Kg/m^2, respectivamente.

A frequência cardíaca variou de 56,0 a 126,0 batimentos por minuto (bpm), com média e desvio padrão de 70,4 bpm e 12,3 bpm, respectivamente.

Foram determinados os genótipos dos voluntários para os três polimorfismos relevantes do gene que codifica a eNOS: $T^{-786}C$ na região promotora, 27-pb VNTR no íntron 4 e $Glu^{298}Asp$ no éxon 7. A frequência de distribuição dos genótipos para cada polimorfismo não apresentou desvio para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não foram observadas diferenças entre os grupos, segundo genótipos dos três polimorfismos, quanto às características dos voluntários: idade, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, índice de massa corporal, frequência cardíaca, concentração de mercúrio no sangue (Hg sangue) e as concentrações plasmáticas de nitrito (todos com $p>0,05$) (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo na região promotora ($T^{-786}C$) do gene que codifica a eNOS.

Variáveis	Total (n=214)	Genótipos			P
		TT (n=131)	TC (n=71)	CC (n=12)	
Idade (anos)	40,7 ± 15,5	41,2 ± 15,4	39, ± 15,3	45,0 ± 18,2	**NS**
PAS (mmHg)	119,8 ± 19,3	120,1 ± 19,7	119,4 ± 19,6	118,3 ± 14,4	**NS**
PAD (mmHg)	71,8 ± 10,6	72,1 ± 10,8	71,7 ± 10,3	68,7 ± 9,9	**NS**
IMC (Kg/m^2)	24,5 ± 4,2	24,4 ± 4,3	24,9 ± 4,3	24,1 ± 3,3	**NS**
FC (bpm)	70,4 ± 12,3	70,9 ± 12,8	70,7 ± 11,6	63,8 ± 9,8	**NS**
Hg sangue (µg/L)	50,5 ± 35,2	54,4 ± 36,6	42,4 ± 31,3	55,0 ± 36,4	**NS**
Nitrito (ηM)	251,1 ± 106,5	251,2 ± 114,2	255,2 ± 93,1	227,2 ± 97,8	**NS**

Os valores representam a média e desvio padrão, respectivamente.
PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IMC, índice de massa corporal; FC, frequência cardíaca; Hg sangue, concentração de mercúrio no sangue total; Nitrito, concentração plasmática de nitrito; NS, estatisticamente não significativo, segundo o teste estatístico ANOVA.

Tabela 2. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo no íntron 4 (27-pb VNTR) do gene que codifica a eNOS.

Variáveis	Genótipos			P
	4a4a (n=10)	**4a4b (n=61)**	**4b4b (n=143)**	
Idade (anos)	34,5 ± 15,7	39,6 ± 16,7	41,6 ± 14,9	**NS**
PAS (mmHg)	108,3 ± 15,6	116,6 ± 16,4	122,0 ± 20,3	**NS**
PAD (mmHg)	62,8 ± 11,1	69,3 ± 9,5	73,5 ± 10,5	**NS**
IMC (Kg/m^2)	21,8 ± 4,1	25,0 ± 4,7	24,5 ± 3,9	**NS**
FC (bpm)	65,1 ± 14,4	71,9 ± 12,4	70,2 ± 12,1	**NS**
Hg sangue (µg/L)	52,0 ± 28,2	54,7 ± 37,2	48,5 ± 34,8	**NS**
Nitrito (ηM)	181,9 ± 57,9	233,1 ± 104,5	263,7 ± 107,5	**NS**

Os valores representam a média e desvio padrão, respectivamente.
PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IMC, índice de massa corporal; FC, frequência cardíaca; Hg sangue, concentração de mercúrio no sangue total; Nitrito, concentração plasmática de nitrito; NS, estatisticamente não significativo, segundo o teste estatístico ANOVA.

Tabela 3. Características dos voluntários agrupados por genótipo do polimorfismo no éxon 7 ($Glu^{298}Asp$) do gene que codifica a eNOS.

Variáveis	Genótipos			P
	GG (n=131)	GT (n=73)	TT (n=10)	
Idade (anos)	41,6 ± 15,6	38,2 ± 14,7	47,8 ± 18,6	**NS**
PAS (mmHg)	121,3 ± 20,6	117,1 ± 17,4	119,6 ± 12,9	**NS**
PAD (mmHg)	72,8 ± 10,9	70,3 ± 10,3	69,8 ± 6,4	**NS**
IMC (Kg/m^2)	24,5 ± 4,1	24,7 ± 4,6	24,3 ± 3,2	**NS**
FC (bpm)	70,1 ± 11,1	71,8 ± 14,5	65,4 ± 9,4	**NS**
Hg sangue (µg/L)	49,0 ± 33,7	51,8 ± 37,8	59,7 ± 37,8	**NS**
Nitrito (ηM)	255,1 ± 108,0	244,6 ± 106,1	246,3 ± 95,9	**NS**

Os valores representam a média e desvio padrão, respectivamente.
PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IMC, índice de massa corporal; FC, frequência cardíaca; Hg sangue, concentração de mercúrio no sangue total; Nitrito, concentração plasmática de nitrito; NS, estatisticamente não significativo, segundo ANOVA.

Para avaliar a possível influência das variações genéticas sobre a produção de óxido nítrico, foram realizados estudos estatísticos de correlação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e as concentrações de Hg no sangue nos voluntários agrupados de acordo com o genótipo de cada polimorfismo separadamente.

Na Figura 7 está representada a associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos voluntários agrupados de acordo com o genótipo da região promotora ($T^{-786}C$) do gene que codifica a eNOS. Na figura 10(A) estão os voluntários homozigotos CC (alelo variante) e heterozigotos, na figura 10(B) estão os voluntários homozigotos TT (alelo selvagem).

Na Figura 8 está representada a associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos voluntários agrupados de acordo com o genótipo 27-pb VNTR no íntron 4 do gene que codifica a eNOS. Na figura 11(A) estão os voluntários homozigotosn 4a4a (alelo variante) junto com os heterozigotos, na figura 11(B) estão os voluntários homozigotos 4b4b (alelo selvagem).

A Figura 9 representa a associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos voluntários agrupados de acordo com o genótipo $Glu^{298}Asp$ que ocorre no éxon 7 do gene que codifica a eNOS. Na figura 12(A) são os voluntários homozigotos TT (alelo variante) junto com os heterozigotos, na figura 12(B) são indivíduos homozigotos GG (alelo selvagem).

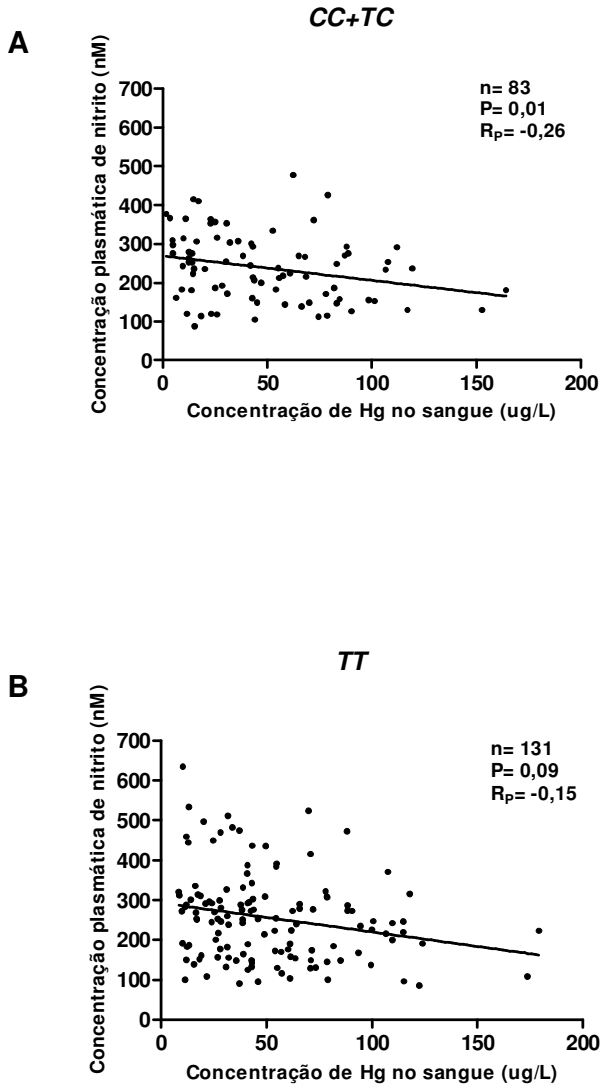
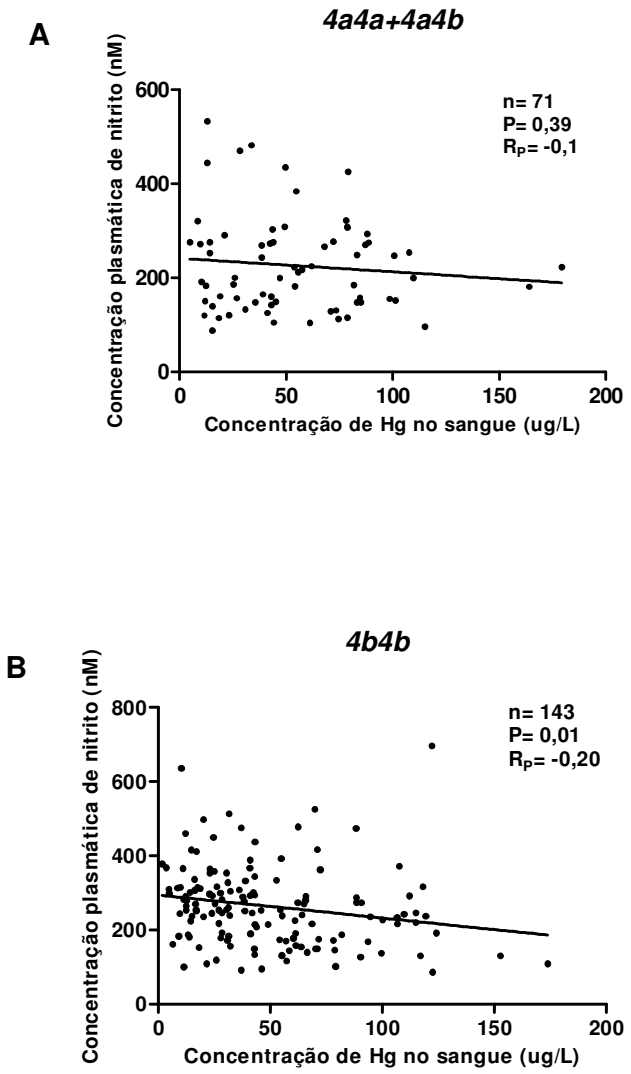


Figura 7 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo da região promotora ($T^{-786}C$) do gene que codifica a eNOS. (A) indivíduos homozigotos CC (alelo variante) e heterozigotos TC; (B) indivíduos homozigotos TT (alelo selvagem). Segundo teste de correlação de Pearson.



C

Figura 8 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo 27-pb VNTR no íntron 4 do gene que codifica a eNOS. (A) indivíduos homozigotos 4a4a (alelo variante) e heterozigotos 4a4b; (B) indivíduos homozigotos 4b4b (alelo selvagem). Segundo teste de correlação de Pearson.

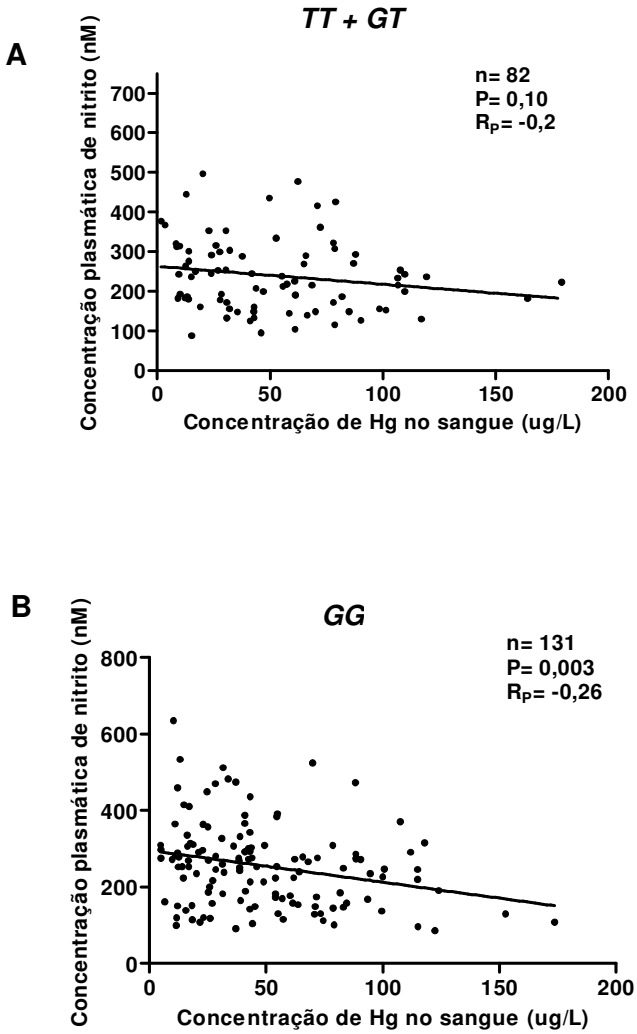


Figura 9 – Associação entre a concentração plasmática de nitrito e concentração de mercúrio no sangue dos indivíduos agrupados segundo o genótipo $Glu^{298}Asp$ (G >T) no éxon 7 do gene que codifica a eNOS. (A) indivíduos homozigotos TT (alelo variante) e heterozigotos GT; (B) indivíduos homozigotos GG (alelo selvagem). Segundo teste de correlação de Pearson.

Para avaliar se o efeito tóxico do Hg era dose dependente, os voluntários agrupados de acordo com o genótipo foram então divididos de acordo com a concentração de Hg no sangue. Assim foram formados dois grupos: um grupo com voluntários que apresentaram valores de Hg no sangue abaixo da mediana (43) e outro grupo com os voluntários que apresentaram valores de Hg acima da mediana. Esse agrupamento foi feito com o objetivo de observar diferenças entre pessoas expostas de maneira moderada e aquelas altamente expostas ao Hg.

A Figura 9 apresenta a concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo TT (alelo variante) e no grupo de voluntários heterozigotos (TC) e homozigotos CC (alelo selvagem), com concentração de Hg no sangue abaixo e acima da mediana (43), respectivamente.

A Figura 10 apresenta a concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo 4b4b (alelo selvagem) e no grupo de voluntários heterozigotos (4a4b) e homozigotos 4a4a (alelo variante), com concentração de Hg no sangue abaixo e acima da mediana (43), respectivamente.

A Figura 11 mostra a concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo GG (Glu – alelo selvagem) e no grupo de voluntários heterozigotos (GT) e homozigotos TT (Asp – alelo variante), com concentração de Hg no sangue abaixo e acima da mediana (43), respectivamente.

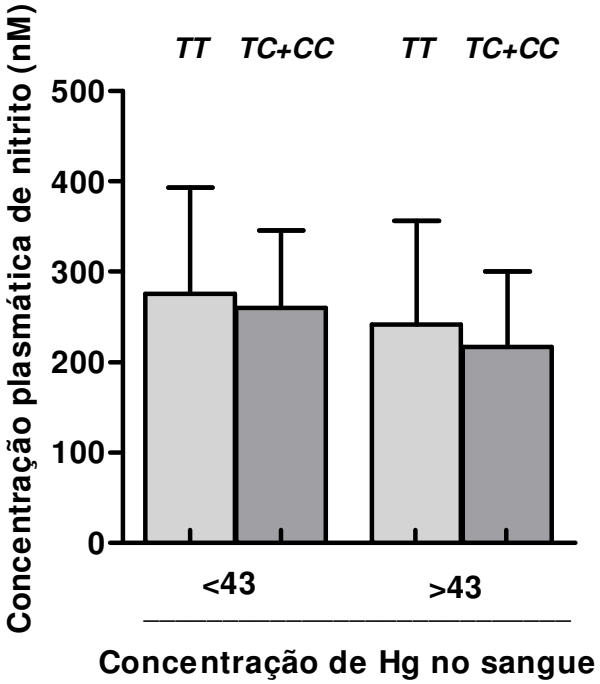


Figura 10 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo TT e no grupo com genótipos TC+CC, com concentração de Hg abaixo da mediana (43) e acima da mediana, respectivamente. As barras correspondem aos valores de média e desvio padrão. P=0,32. Segundo Anova duas vias.

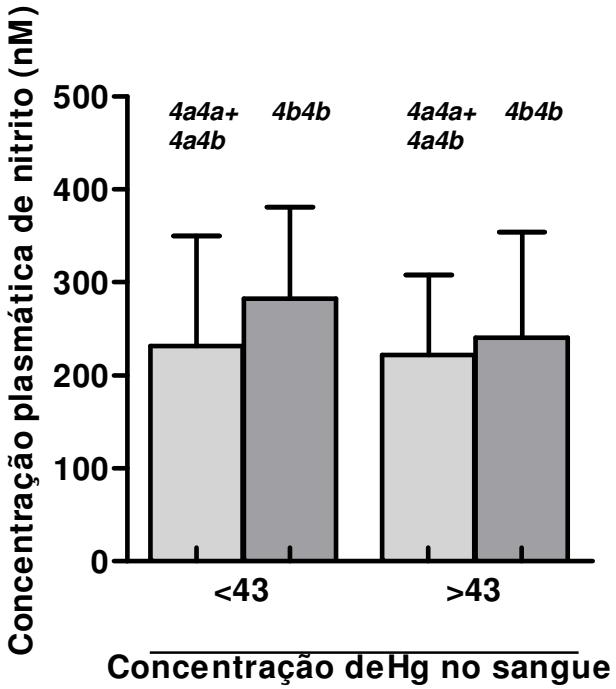


Figura 11 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo 4b4b e no grupo com genótipos 4a4a+4a4b, com concentração de Hg abaixo da mediana (43) e acima da mediana, respectivamente. As barras correspondem aos valores de média e desvio padrão. P=0,09. Segundo Anova duas vias.

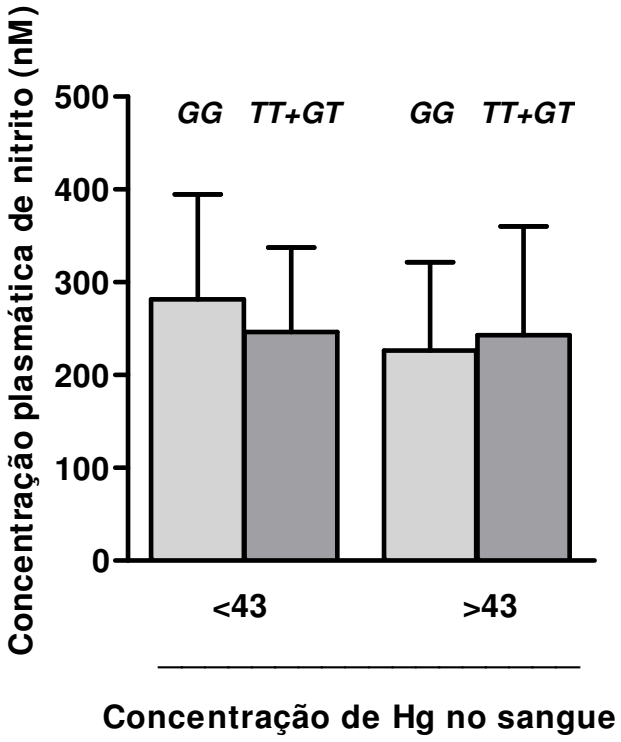


Figura 12 – Concentração plasmática de nitrito no grupo de voluntários com genótipo GG e no grupo com genótipos TT+GT, com concentração de Hg abaixo da mediana (43) e acima da mediana, respectivamente. As barras correspondem aos valores de média e desvio padrão. P=0,53. Segundo Anova duas vias.

A partir dos primeiros resultados, onde cada polimorfismo foi estudado separadamente, foi realizado um estudo mais abrangente denominado análise haplotípica. Nessa etapa os polimorfismos que até então eram observados isoladamente passam a ter seus efeitos analisados em conjunto, assim é possível observar as três variações genéticas atuando simultaneamente, possibilitando a visualização de efeitos mais discretos.

A frequência haplotípica foi obtida com auxílio de programas para determinação da estimativa da distribuição de haplótipos com base nos dados das genotipagens dos três polimorfismos em estudo: $T^{-786}C$, na região promotora do gene; 27-pb VNTR no íntro4 e $Glu^{298}Asp$ no éxon 7.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos a partir da população alvo do presente estudo, bem como frequencia de haplótipos obtida a partir de outros trabalhos publicados, que avaliaram outras populações brasileiras e também populações de outras etnias e outros países.

O haplótipo mais frequente na população estudada combina os alelos selvagens para todos os polimorfismos (T, 4b e G) e o haplótipo menos frequente combina os alelos variantes para esses três polimorfismos.

Tabela 4 - Estimativa da frequência dos haplótipos na população estudada e de outras populações.

Haplótipos			Presente estudo	Tanus-Santos, 2001			Zhao, 2006	Hassan, 2003	Serrano, 2004	Syllos, 2006	Luizon, 2009
$Glu^{298}Asp$	$T^{-786}C$	Intron 4		AA	Cc	As	As	Londres	Colômbia	Brasil	Brasil
G	T	4b	**0,50**	0,46	0,46	0,77	0,80	0,45	0,62	0,41	0,89
G	T	4a	**0,12**	0,27	0,02	0,03	0,07	0,01	0,09	0,06	0,02
G	C	4b	**0,12**	0,07	0,04	0,02	0,007	0,05	0,12	0,24	0,03
G	C	4a	**0,03**	0,05	0,14	0,09	0,08	0,13	0,05	0,04	0,01
T	T	4b	**0,13**	0,09	0,10	0,06	0,09	0,13	0,07	0,14	0,04
T	T	4a	**0,03**	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
T	C	4b	**0,06**	0,06	0,24	0,02	0,004	0,21	0,05	0,08	0,01
T	C	4a	**0,01**	0,00	0,00	0,01	0,005	0,02	0,00	0,01	0,00

AA, americanos e africanos; Cc, caucasianos; As, asiáticos

A Figura 13 apresenta a concentração plasmática de nitrito nos voluntários agrupados de acordo com os possíveis haplótipos.

Somente os haplótipos com frequência acima de 5% foram utilizados, são eles:

- TbG: alelo T do polimorfismo na região promotora, alelo 4b no íntron 4 e alelo G (Glu) no éxon 7;
- TbT: alelo T do polimorfismo na região promotora, alelo 4b no íntron 4 e alelo T (Asp) no éxon 7;
- TaG: alelo T do polimorfismo na região promotora, alelo 4a no íntron 4 e alelo G (Glu) no éxon 7;
- CbG: alelo C do polimorfismo na região promotora, alelo 4b no íntron 4 e alelo G (Glu) no éxon 7;
- CbT: alelo C do polimorfismo na região promotora, alelo 4b no íntron 4 e alelo T (Asp) no éxon 7.

O haplótipo associado a menor concentração plasmática de nitrito combina os alelos selvagens para o polimorfismo no íntron 4 (4b) e no éxon 7 (G) e o alelo variante para o polimorfismo na região promotora (C).

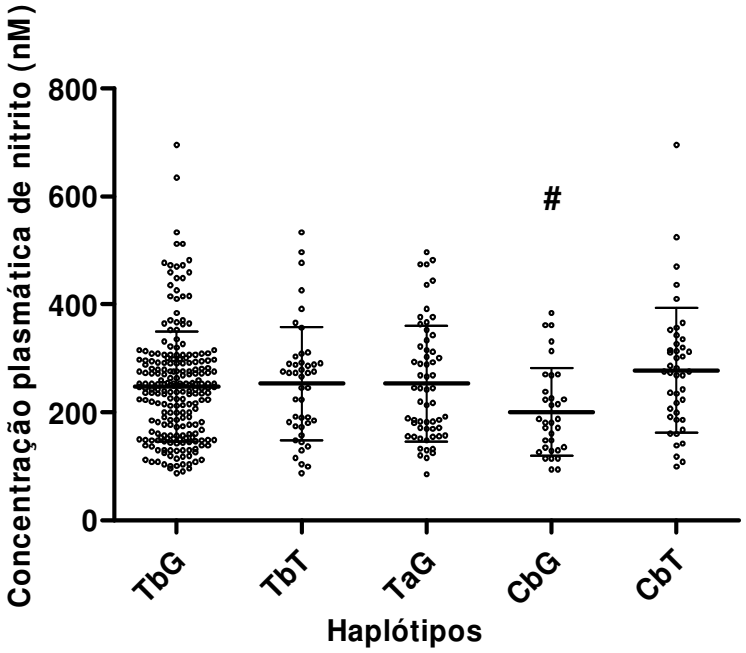


Figura 13 - Concentração plasmática de nitrito nos voluntários agrupados de acordo com a análise haplotípica. As barras representam a média e desvio padrão. # P<0,05 para haplótipo CbG (alelo C, região promotora; alelo 4b, íntron 4 e alelo G, éxon 7) em comparação com os demais haplótipos. Segundo teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn para múltiplas comparações.

DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo a investigar a possível influência da exposição ambiental ao mercúrio sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico frente às variações genéticas no gene que codifica a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Foi avaliado como os polimorfismos na região promotora ($T^{-786}C$), no íntron 4 (27-pb VNTR) e no éxon 7 ($Glu^{298}Asp$) influenciam a biodisponibilidade de NO, através da correlação entre o marcador biológico de exposição ao Hg (sangue) e o marcador plasmático da biodisponibilidade de NO (nitrito).

Vários trabalhos realizados na região amazônica têm reportado a alta exposição ambiental ao metilmercúrio ocorrido através do consumo de peixe (HARADA et al, 2001; MALM et al, 1995; DOLBEC et al, 2001; PASSOS; MERGLER, 2008).

Estudos reportam a associação entre a exposição ao mercúrio e o aumento do risco de infarto do miocárdio, progressão de processos ateroscleróticos, dentre outras doenças cardiovasculares (DCV) (SALONEN et al, 1995; SALONEN, 1998; SALONEN et al, 2000; VIRTANEN et al, 2007; CHOI et al, 2009; MOZAFFARIAN, 2009).

É cada vez maior o interesse sobre a relação entre as concentrações de mercúrio em marcadores biológicos de exposição e o aumento do risco a doenças cardiovasculares, uma vez que tem sido observado que essas são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em indivíduos exposto ao mercúrio.

De acordo com estudos experimentais, o Hg provoca danos estruturais e funcionais irreversíveis nas células endoteliais, diminui a atividade da enzima óxido nítrico sintase e, portanto provoca uma redução na produção de NO (KISHIMOTO; OGURI; TADA, 1995; KUO; HUANG; LIN-SHIAU, 2002; GOLPON et al, 2003).

A homeostase do sistema cardiovascular é influenciada pelo óxido nítrico, sendo este alvo relevante de xenobióticos cardiotóxicos. Alterações na produção e/ou biodisponibilidade do NO são capazes de aumentar a agregação plaquetária, aumentar a pressão arterial, diminuir a irrigação sanguínea dos tecidos, entre outros efeitos.

No presente estudo observamos que o MeHg promove diminuição nas concentrações de nitrito plasmático, o que reflete uma diminuição na produção e/ou na biodisponibilidade de NO, avaliado através da concentração plasmática de nitrito.

O nitrito é um produto do metabolismo oxidativo do óxido nítrico. Estudos in vivo reportam que a quantificação plasmática do nitrito reflete alterações na atividade da óxido nítrico sintase em humanos (LAUER et al, 2002; KLEINBONGARD et al, 2006)

Estudos mostram que a ativação da eNOS, enzima responsável pela síntese do NO, é acompanhado por correspondente aumento nas concentrações de nitrito circulante, além de não sofrer alterações decorrentes da dieta (KLEINBONGARD et al, 2006). Baixas concentrações de nitrito foram associadas a infarto do miocárdio (KEHMEIER et al, 2008), sugerindo ser o nitrito um potencial marcador de risco cardiovascular.

Como a produção do NO é dependente da atividade da eNOS, a presença de mutações (polimorfismos) no gene que codifica essa enzima são de grande interesse, principalmente pela possibilidade de atuarem sinergicamente com o MeHg.

Inicialmente foi observado que a população em estudo não apresentou desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrando, portanto que se trata de uma população suficientemente grande na qual os acasalamentos acontecem ao acaso e onde não há migração significativa, evitando a interpretação de resultados equivocados.

O gene da eNOS está localizado no cromossomo 7 e é expresso nas células do endotélio vascular (MARSDEN et al, 1993). O polimorfismo $T^{-786}C$, na região promotora, é de grande importância para regulação da taxa de transcrição do gene da eNOS (NAKAYAMA et al, 1999). Em humanos, esse polimorfismo tem sido associado a várias doenças cardiovasculares, incluindo espasmos coronarianos, infarto do miocárdio e doenças na artéria coronária (NAKAYAMA et al, 1999; YOSHIMURA et al, 2000; CATTARUZZA et al, 2004).

Inicialmente nossos resultados mostraram que o efeito do Hg sobre a produção de NO seria maior nos indivíduos portadores do alelo C (variante), em comparação com os indivíduos portadores do alelo T (selvagem), causando uma diminuição significativa na concentração plasmática de nitrito de maneira concentração-dependente (Figura 7).

Os resultados do presente estudo são consistentes com outros estudos onde o alelo C se mostra associado a doenças cardiovasculares decorrentes de disfunção endotelial e diminuição na produção de NO.

Nakayama et al. (1999) foram os primeiros a demonstrar que o polimorfismo $T^{-786}C$ modifica distintamente a eficiência da transcrição gênica. Neste trabalho foi observado que a presença do alelo C na região promotora reduzia em aproximadamente 50% a atividade do promotor comparada ao alelo T, estando também associado a espasmo coronariano.

Em dois estudos com populações diferentes, um deles utilizando uma análise de regressão multivariada, reportaram que os indivíduos portadores do alelo C (CC+TC) apresentavam risco quase 3 vezes maior de sofrer de doença arterial coronariana em relação aos indivíduos portadores do alelo T (ROSSI et al, 2003; TANGUREK et al, 2006; YILMAZ et al, 2006).

Hyndman et al. (2002) reportaram uma associação significante entre hipertensão essencial e os indivíduos portadores do alelo C.

Em estudos caso-controle, os indivíduos com síndrome coronariana aguda apresentavam maior frequência do genótipo CC, quando comparados aos indivíduos controles (DOSENKO et al, 2006; CIFTCI et al, 2008). Em trabalho recentemente publicado, Ko et al. (2008) mostraram que indivíduos com genótipo CC apresentavam risco aumentado de vasoespasmo, quando comparados com indivíduos com genótipos TC e TT. Esse genótipo também tem sido associado com aumento no risco de restenose (estreitamento) da artéria coronária, causado por crescimento da camada de células do músculo liso vascular (GOMMA et al, 2002), hipertensão e doenças cardiovasculares (BHANDARY et al, 2008).

Em contrapartida, alguns trabalhos não observaram associação entre este polimorfismo e alterações na produção de NO (METZGER et al, 2005; COLOMBA et al, 2008). Kajiyama et al. (2000) colaboradores concluíram que o alelo C do polimorfismo na região promotora não está associado à hipertensão essencial.

Um segundo polimorfismo presente no íntron 4 também é bastante discutido como regulador da atividade da eNOS. Este polimorfismo pode funcionar como um potencial regulador da transcrição do gene da eNOS e consequente expressão alterada do RNAm e dos níveis protéicos desta enzima (WANG; WANG, 2000; SONG et al, 2003; SENTHIL et al, 2005). A presença do alelo 4a (alelo variante) foi associada a um aumento em mais de 4 vezes na atividade enzimática da eNOS e um aumento significativo na quantidade de mRNA e proteína (WANG et al, 2000).

No presente estudo foi observado que os indivíduos portadores do alelo 4a não apresentam uma redução significativa nas concentrações de nitrito plasmático

decorrentes da exposição ao mercúrio. Em contrapartida, nas pessoas portadoras do alelo 4b esse efeito é acentuado, ou seja, concentrações crescentes de Hg provocam diminuição significante na produção de NO (Figuras 8).

Esses achados sugeriram que a presença do alelo 4b pode conferir aos indivíduos maior suscetibilidade aos efeitos tóxicos do Hg sobre a produção de NO e consequente aumento nos riscos de danos cardiovasculares.

A mutação no íntron 4 do gene da eNOS foi estudada por Cine et al. (2002) que demonstraram uma associação entre este polimorfismo e doença arterial coronariana, especialmente na ausência de fatores de risco secundários.

Yemisci et al. (2009) reportaram em estudo caso-controle que o genótipo 4a4a apresenta papel protetor para infarto lacunar, um tipo de acidente vascular cerebral.

Vários outros estudos encontraram associação entre este polimorfismo e doenças como: infarto do miocárdio (HIBI et al, 1998; HOOPER et al, 1999; PARK et al, 2000), tromboembolismo (HOOPER et al, 1999); doença da artétia coronária (WANG et al, 1996) e hipertensão (UWABO et al, 1998; PULKKINEN et al, 2000).

Entretanto há divergências entre os trabalhos que avaliam o polimorfismo no intron 4 como fator de risco para doenças cardiovasculares. Um estudo com pacientes hipertensos e controles normotensos reportou que, de maneira geral, não se observa correlação entre o polimorfismo no íntron 4 e hipertensão, entretanto quando apenas os homens são observados, a presença do alelo 4a confere um risco 5 vezes maior para desenvolvimento da doença (PATKAR et al, 2009). Outro estudo com mais de 600 voluntários mostrou que a frequência do alelo 4a é significativamente maior entre indivíduos hipertensos do que nos controles (JEMAA et al, 2009).

Outros dois estudos apontam não haver associação entre os polimorfismos da eNOS e qualquer tipo de alterações no sistema cardiovascular (KREX et al, 2006; COLOMBA et al, 2008).

Um terceiro polimorfismo ocorre no éxon 7 do gene que codifica a enzima responsável pela síntese de NO, é uma variação do tipo SNP denominado $Glu^{298}Asp$, caracterizado pela presença de uma guanina (G - mais comum) ou uma timina (T - mais raro) no nucleotídeo 894. A presença de G ou de T acarreta mudança do aminoácido Glutamato por Aspartato na posição 298 ($Glu^{298}Asp$) da proteína eNOS, respectivamente.

Ao contrário de muitos trabalhos, o presente estudo mostrou que a presença do alelo G está associada a reduções significativas nas concentrações de nitrito plasmático, quando comparados aos demais genótipos (Figura 9).

Inúmeros trabalhos estudam a associação desse variante genético com a produção basal de NO e doenças cardiovasculares (VELDMAN et al, 2002) e os resultados muitas vezes são divergentes.

Noiri et al. (2002) demonstraram que a presença do alelo T (Asp) reduz em 3 vezes a produção de NO em resposta à adição de ionóforo de cálcio, quando comparado com alelo G (Glu). Apesar de diversos trabalhos não demonstrarem mudanças bioquímicas entre os variantes in vitro, estudos in vivo indicam que a presença destes pode alterar mecanismos de regulação da atividade da eNOS, como as cascatas de fosforilação e as interações proteína-proteína (MONTEIRO, 2002; LANDAR; DARLEY-USMAR, 2003).

Em um estudo com pacientes hipertensos foi observado que o alelo T é mais frequente entre os pacientes que entre os controles (SRIVASTAVA et al, 2008). Ainda com relação a esse polimorfismo, outros trabalhos mostraram associação do alelo T com hipertensão e doenças cardiovasculares (HIBI et al, 1998; VELDMAN et al, 2002; BHANDARY et al, 2008). Em 2003, Chang et al. mostraram que o polimorfismo $Glu^{298}Asp$ no éxon 7 do gene da eNOS estava fortemente associado a casos de espasmos coronarianos.

Wolff et al. (2005) também reportaram que esse polimorfismo é associado com doença aterosclerótica nos vasos sanguíneos e que indivíduos com genótipo TT apresentavam predisposição para desenvolvimento de degeneração arterosclerótica, evento precedente de infarto do miocárdio.

A presença do alelo T foi relatada por vários estudos com um fator de risco para aterosclerose (LEMBO et al, 2001), doença cardíaca isquêmica (TAMEMOTO; ISHIKAWA; KAWAKAMI, 2008), doença arterial coronariana e infarto do miocárdio (HINGORANI et al, 1999; COLOMBO et al, 2002, 2003).

Entretanto, em trabalho recente, Guldiken et al. (2009) estudaram pacientes acometidos de choque isquêmico e não observaram associação com o polimorfismo $Glu^{298}Asp$ na eNOS.

Apesar desses resultados iniciais demonstrarem que há uma correlação entre a presença de determinado alelo e um efeito mais acentuado do Hg sobre a concentração plasmática de nitrito, quando os voluntário foram agrupados de acordo

com o genótipo e o nível de exposição ao Hg, simultaneamente, foi observado que esse efeito desapareceu, ou seja, de acordo com o teste estatístico aplicado, o efeito sobre a concentração de nitrito era devido a concentração de Hg e não decorrente do polimorfismo, sugerindo assim que a concentração de mercúrio poderia estar mascarando o efeito do polimorfismo genético, deste modo nas figuras 10, 11 e 12 não foi observada a influência do polimorfismo sobre a concentração plasmática de nitrito.

Somado aos resultados um pouco conflitantes do presente estudo, uma grande quantidade publicações reportam resultados contraditórios. Assim tornou-se bastante interessante a utilização de abordagem mais abrangente, que possibilitasse a visualização dos efeitos de variações genéticas, as quais, quando observadas isoladamente, não eram claras. Nesse sentido, realizamos uma análise haplotípica, ou seja, um estudo da combinação dos alelos dos polimorfismos em um mesmo gene (haplótipo) que pudesse estar associado à diminuição na produção e biodisponibilidade do NO.

Estudos reportam que essa análise apresenta maior poder de detecção de pequenas diferenças, em comparação com a análise feita utilizando somente um único polimorfismo (JOHNSON et al, 2001; WANG; DUDLEY; WANG, 2002; ZHAO; PFEIFFER; GAIL, 2003).

O haplótipo mais frequente na população combinou os alelos selvagens dos três polimorfismos, G-T-4b, o mesmo se observa em outros estudos com outras populações, tanto em populações brasileiras como populações de outros países e grupos étnicos.

O haplótipo menos frequente nessa população combina os alelos variantes dos três polimorfismos, T-C-4a, semelhante ao que ocorre nos demais estudos onde esse haplótipo é um dos de menor freqüência, junto com o haplótipo T-T-4a, que também reúne os dois alelos variantes do exon 7 e intron 4 e o alelo selvagem da região promotora.

O perfil das frequências dos haplótipos, de maneira geral, não apresentou a mesma distribuição quando comparada a outras populações, exceto para o haplótipo mais frequente e para o menos frequente, para os quais todas as população estavam em concordância (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART, 2001; ZHAO et al, 2006; HASSAN, 2004; SERRANO et al, 2004; deSYLLOS et al, 2006; LIUZON et al, 2009)

A distribuição das frequências haplotípicas da população do presente estudo apresentou semelhanças com relação ao estudo de Serrano et al. (2004), com uma população colombiana, e também com o estudo de Syllos et al (2006), com uma população brasileira da região sudeste, e uma leve semelhança com o perfil de americanos-africanos, do estudo de Tanus-Santos et al. (2001).

Apesar de a população estudada ser composta por voluntários ribeirinhos da região amazônica, a frequência dos haplótipos não apresentou grande semelhança com os resultados do estudo recentemente realizado em ameríndios também na região amazônica, sugerindo que apesar de serem provenientes da mesma região, os voluntários desse estudo aparentemente não são de descendência indígena (LUIZON et al, 2009).

Com a análise haplotípica foi possível observar que a concentração plasmática de nitrito apresenta alterações em decorrência da combinação alelica. Concentrações menores de nitrito foram observadas para o haplótipo G-C-4b, que combina os alelos selvagens dos polimorfismos no éxon 7 (G) e no íntron 4 (4b), e o alelo variante do polimorfismo na região promotora (C). Esse achado está em concordância com outro estudo que mostra que esse mesmo haplótipo (G-C-4b) está associado a baixas concentrações plasmáticas de nitrito, mesmo quando o estudo dos polimorfismos isoladamente não apresenta efeito sobre essa variável (METZGER; SERTORIO; TANUS-SANTOS, 2007).

Esse resultado reforça os achados anteriores, nos quais os mesmo alelos observados isoladamente conferiram maior suscetibilidade aos efeitos do Hg sobre a concentração plasmática de nitrito. Nos haplótipos, da mesma forma, quando esses mesmos alelos são combinados, promovem uma diminuição significativa na produção de NO (Figura 13).

O presente estudo apresenta limitação a serem consideradas:

- Devido a dificuldades de coleta, transporte e armazenamento das amostras de sangue, o número de voluntários não foi suficientemente grande para que pudesse ser realizado um estudo entre homens e mulheres, separadamente. Esse achado poderia revelar um comportamento diferente influenciado pelo gênero dos participantes.

- A produção científica de estudos envolvendo polimorfismos genéticos muitas vezes reporta dados conflitantes e assim sugere que outros fatores possam estar exercendo influência sobre essas relações entre os variantes genéticos e as

doenças cardiovasculares. Dessa forma a obtenção de dados referentes à alimentação, exercícios físicos, padrão de estresse diário, tabagismo, bem como alguns resultados de exames laboratoriais poderiam elucidar esse viés que por vezes parece ocorrer nos estudos dessa natureza, uma vez que todos esses fatores citados conhecidamente atuam sobre o sistema cardiovascular e muitos são fatores de risco para tais doenças. Somado a isso outros componentes da alimentação podem exercer um papel protetor do sistema cardiovascular, muitos dos quais estão presentes na própria alimentação dos ribeirinhos, principalmente nos peixes ingeridos, como no caso do selênio e ômega-3, conhecidos por auxiliarem no processo de detoxificação do mercúrio.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível concluir que, assim como relatado em estudos experimentais, o mercúrio promove uma diminuição na concentração plasmática de nitrito e, portanto interfere na produção e/ou na biodisponibilidade do óxido nítrico. Além disso, no estudo dos polimorfismos foi verificado que a presença do alelo C na região promotora, do alelo 4b no íntron 4 e do alelo G no polimorfismo do éxon 7 confere aos voluntários maior suscetibilidade ao efeito do Hg sobre as concentrações plasmáticas de nitrito; entretanto quando a população foi estratificada a concentração de Hg aparentemente mascarou o efeito desses alelos.

Por fim, ao término da analise dos haplótipos, isto é, o estudo dos efeitos dessas variações genéticas agindo simultaneamente sobre o óxido nítrico, foi possível concluir que a combinação desses mesmos alelos (C, 4b, G) está associada a concentrações reduzidas de nitrito plasmático.

Finalmente, o presente estudo sugere que os fatores genéticos exercem grande influência sobre a produção e biodisponibilidade de NO e que esses fatores combinados com a exposição ambiental ao Hg podem agir de maneira sinérgica, aumentando a suscetibilidade aos efeitos cardiotóxicos do metal através da modulação da atividade da eNOS. Entretanto quando da realização de estudos dessa natureza é fundamental a obtenção do maior número de informações sobre todas as co-variáveis que possam exercer alguma influência sobre a relação estudada, bem como é relevante que o estudo seja realizado com um número

relativamente grande de voluntários, tornando possível a estratificação dos indivíduos e a obtenção de resultados mais exatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAS, O. et al. Endothelial nitric oxide gene polymorphism (Glu298Asp) is not associated with coronary artery disease in Turkish population. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**.v. 27, n. 2, p. 347-349, 2002.

ATSDR. Toxicological Profile for Mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry US Department of Health and Human Services of United State. 1999.

BAKIR, F. et al. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science.** V. 181, p.230-241, 1973.

BARBOSA, A. C. et al. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v. 45, n. 2, p. 235-346, 2003.

BARBOSA, JR. F, et al. eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. **Nitric Oxide**. V. 14, n. 1, p. 58-64, 2006.

BELIVEAU, A. et al. Early Hg mobility in cultivated tropical soils one year after slash-and-burn of the primary forest, in the Brazilian Amazon. **The Science of the total environment**. v. 407, n. 15, p. 4480-9, 2009.

BHANDARY, U. V. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with hypertension and cardiovascular disease in renal transplantation. **Nephrology**. v. 13, n. 4, p. 348-55, 2008.

CABANERO, A. I.; MADRID, Y.; CAMARA, C. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. **Biological Trace Element Research.** v. 119, n. 3, p.195-211, 2007.

CARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**. v. 110, p. 11-23, 2002. Supplement 1.

CASTOLDI, A. F.; COCCINI, T.; MANZO, L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. **Reviews on Environmental Health**. v. 18, n. 1, p. 19-31, 2003.

CATTARUZZA, M. et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. **Circulation research**. v. 95, n. 8, p. 841-7, 2004.

CHAN, H. M.; EGELAND, G. M. Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases. **Nutrition reviews**. v. 62, n. 2, p. 68-72, 2004.

CHANG, K. et al. The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. **Coronary artery disease**. v. 14, n. 4, p. 293-9, 2003.

CHARLES, I. G. et al. Expression of human nitric oxide synthase isozymes. **Methods in Enzymology**. v. 268, p. 449-60, 1996.

CHOI, A. L. et al. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. **Environmental Health Perspectives**. v. 117, n. 3, p. 367-71, 2009.

CIFTCI, C. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. **Lipids in health and disease**. v. 7, n. 5, 2008.

CINE, N.; HATEMI, A. C.; ERGINEL-UNALTUNA, N. Association of a polymorphism of the ecNOS gene with myocardial infarction in a subgroup of Turkish MI patients. **Clinical Genetics.** v. 61, n. 1, p. 66-70, 2002.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**. v. 110, p. 11-23, 2002. Supplement 1.

COLOMBA, D. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study. **Immunity and Ageing**. v. 5, p. 1-4, 2008.

COLOMBO, M. G. ET al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. **Clinical chemistry**. v. 49, n. 3, p. 389-95, 2003.

COLOMBO, M. G. et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. **Heart (British Cardiac Society)**. v. 87, n. 6, p. 525-8, 2002.

COSBY, K. et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat Med. v. 9, n. 12, p. 1498-505, 2003.

DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 41, p. 203-36, 2001.

deSYLLOS, R. W. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. **Nitric Oxide**. v. 15, n. 4, p. 417-22, 2006.

DOLBEC, J. et al. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **The Science of the total environment**. v. 271, n. 1-3, p. 87-97, 2001.

DOREA, J. G.; BARBOSA, A. C.; SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comparative Biochemitry and Physiology. Part. C: Toxicology and Pharmacology**. v. 142, n. 3-4, p. 275-83, 2006.

DOSENKO, V. E. et al. Allelic polymorphism in the promoter (T-->C), but not in exon 7 (G-->T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. **Experimental and clinical cardiology**. v. 11, n. 1, p. 11-3, 2006.

FITZGERALD, W. F.; CLARKSON, T.W. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. **Environmental Health Perspectives**. v. 96, p. 159-166, 1991.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 284, n. 1, p.1-12, 2003.

GEIER, M. R.; GEIER, D. A. Neurodevelopmental disorders after thimerosal-containing vaccines: a brief communication. **Experimental Biology and Medicine**. v. 228, n. 6, p.660-4, 2003.

GLADWIN, M. T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chemical Biology**. v.1, n. 6, p. 308-14, 2005.

GOLPON, H. A. et al. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. **Toxicology**. v. 192, n. 2-3, p. 179-88, 2003.

GOMMA, A. H. et al. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis. **European Heart Journal**. v. 23, n. 24, p. 1955-62, 2002.

GRAU, M. et al. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. **Journal of Chromatography**. v. 851, n. 1-2, p. 106-23, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

GULDIKEN, B. et al. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Turkish patients with ischemic stroke. **Molecular Biology Reports**. v. 36, n. 6, p.1539-43, 2009.

GUZZI, G.; LA PORTA, C. A. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology.** v. 244, n. 1, p.1-12, 2008.

HARADA, M. et al. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environment International**. v. 27, n. 4, p. 285-90, 2001.

HASSAN, A. et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. **Stroke**. v. 35, n.3, p. 654-9, 2004.

HENDGEN-COTTA, U. B. et al. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.** v. 105, n. 29, p.10256-61, 2008.

HIBI, K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. **Hypertension.** v. 32, n. 3, p. 521-6, 1998.

HINGORANI, A. D. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. **Current Hypertension Reports**. v. 5, n. 1, p. 19-25, 2003.

HINGORANI, A. D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**. v. 100, n. 14, p. 1515-20, 1999.

HINGORANI, A. D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. **Atherosclerosis.** v. 154, n. 3, p. 521-7, 2001.

HOOPER, W. C. et al. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial

infarction and venous thromboembolism in African Americans. **Chest.** v. 116, n. 4, p. 880-6, 1999.

HYNDMAN, M. E. et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. **Hypertension.** v. 39, n. 4, p. 919-22, 2002.

INSKIP, M. J.; PIOTROWSKI, J. K. Review of the health effects of methylmercury. **Journal of Applied Toxicology.** v. 5, p. 113-33, 1985.

JEMAA, R. et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. **Clinical Biochemistry**. v. 42, n. 9, p. 852-6, 2009.

JOHNSON, G. C. et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. **Nature Genetics**. v. 29, n. 2, p. 233-7, 2001.

JOSHI, M. S.; BAUER, J. A. Preliminary computational modeling of nitric oxide synthase 3 interactions with caveolin-1: influence of exon 7 Glu298Asp polymorphism**. Acta Biochimica and Biophysica.** v. 40, n. 1, p. 47-54, 2008.

KAJIYAMA, N. et al. Lack of association between T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. **Hypertension Research**. v. 23, n. 6, p. 561-5, 2000.

KEHMEIER, E. S. et al. Serial measurements of whole blood nitrite in an intensive care setting. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 44, n. 11, p. 1945-50, 2008.

KISHIMOTO, T.; OGURI, T.; TADA, M. Effect of methylmercury (CH3HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. **Toxicology.** v. 103, n. 1, p. 1-7, 1995.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 40, n. 2, p. 295-302, 2006.

KO, N. U. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (-786T->C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** v. 39, n. 4, p. 1103-8, 2008.

KREX, D. et al. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic variants in European patients with intracranial aneurysms. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**. v. 26, n. 10, p. 1250-5, 2006.

KUO, T. C.; HUANG, C. I.; LIN-SHIAU, S. Y. Methylmercury inhibits nitric oxide production mediated by Ca(2+) overload and protein kinase A activation. **Toxicology**. v. 176, n. 1-2, p. 113-22, 2002.

LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V. M. Nitric oxide and cell signaling: modulation of redox tone and protein modification. **Amino Acids**. v. 25, n. 3-4, p. 313-21, 2003.

LAUER, T.; KLEINBONGARD, P.; KELM, M. Indexes of NO bioavailability in human blood. **News Physiology Science**. v. 17, p. 251-5, 2002.

LEBEL, J. et al. Neurotoxic effects of lowlevel methylmercury contamination in the Amazon basin. **Environmental Research.** v. 79, p. 20-32, 1998.

LEMBO, G. et al. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. **Stroke**. v. 32, n. 3, p. 735-40, 2001.

LEMIRE, M. et al. Elevated blood selenium levels in Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**. v. 366, p. 101-111, 2006.

LUIZON, M.R. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. **DNA Cell Biology**. v. 28, n. 7, p. 329-34, 2009.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 7, n. 2, p. 156-67, 2008.

MALM, O. et al. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajos river basin, Brazil**. The Science of the total environment**. v. 175, n. 2, p. 141-50, 1995.

MARRONI, A. S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide. v.** 12, n. 3, p. 177-82, 2005.

MARSDEN, P. A. et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 23, p. 17478-88, 1993.

MARSON, B. P. eNOS polymorphisms in hypertension. **Clinica Chimica Acta**. v. 390, n. 1-2, p. 161, 2008.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends of Biochemistry Science**. v. 22, n. 12, p. 477-81,1997.

METZGER, I. F. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. **Pharmacogenetics and Genomics.** v. 15, n. 8, p. 565-70, 2005.

METZGER, I. F.; SERTORIO, J. T.; TANUS-SANTOS, J. E. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. **Free Radical Biology Medicine**. v. 43, n. 6, p. 987-92, 2007.

MONTEIRO, H. P. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? **Free Radical Biology and Medicine.** v. 33, n. 6, p. 765-73, 2002.

MOZAFFARIAN, D. Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 6, n. 6, p. 1894-916, 2009.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **JAMA**. v. 296, n. 15, p. 1885-99, 2006.

MURATA, K.; BUDTZ-JØRGENSEN, E.; GRANDJEAN, F. Benchmark Dose Calculations for Methylmercury- Associated Delays on Evoked Potential Latencies in Two Cohorts of Children. **Risk Analysis**. V. 22, n. 3, 2002.

NAGASSAKI, S. et al. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. **Thrombosis Research**. v. 115, n. 5, p. 375-9, 2005.

NAKAYAMA, M. et al. T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. **The American Journal of Cardiology**. v. 86, n. 6, p. 628-34, 2000.

NAKAYAMA, M. et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation.** v. 99, n. 22, p. 2864-70, 1999.

NOIRI, E. et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. **Hypertension**. v. 40, n. 4, p. 535-40, 2002.

ORMEZZANO, O. et al. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with circadian blood pressure rhythm. **Journal of Human Hypertension**. 2007 Jun;21(6):501-3.

PALMER, C. D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta, Part B**. v. 61, p. 980-90, 2006.

PARK, J. E. et al. Aging affects the association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction in the Korean male population. **Korean Journal of Intern Medicine**. v. 15, n. 1, p. 65-70, 2000.

PASSOS, C. J.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24, p. 503-20, 2008. Supplement 4.

PASSOS, C. J. S. et al. Epidemilogic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environmental Research.** v. 105, p. 183-93, 2007.

PASSOS, C. J. S. et al. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environmental Research.** v. 93, p. 123-30, 2003.

PATKAR, S. et al. High risk of essential hypertension in males with intron 4 VNTR polymorphism of eNOS gene. **Indian Journal of Human Genetics**. v. 15, n. 2, p. 49-53, 2009.

POREBSKA, M. The Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular System. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**. v. 17, n. 1, p. 101-7, 2008.

PULKKINEN, A. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. **Journal of Molecular Medicine**. v. 78, n. 7, p. 372-9, 2000.

RACZ, W. J.; VANDEWATER, L. J. Perspectives on the central nervous system toxicity of methylmercury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 60, n. 7, p. 1037-45, 1982.

ROSSI, G. P. et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. **Journal of the American College of Cardiology**. 2003 Mar 19;41(6):930-7.

SALONEN, J. T. et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. **Circulation**. v. 91, n. 3, p. 645-55, 1995.

SALONEN, J. T. et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**. v. 148, n. 2, p. 265-73, 2000.

SALONEN, J. T. Excessive intake of iron and mercury in cardiovascular disease. **Bibliotheca nutrition and dieta**. v. 54, p.112-26, 1998.

SANDRIM, V. C. et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. **Pharmacogenomics**. v. 9, n. 10, p. 1467-73, 2008.

SENTHIL, D. et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. **DNA Cellular Biology**. v. 24, n. 4, p. 218-24, 2005.

SERRANO, N. C. et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. **Hypertension**. v. 44, n. 5, p. 702-7, 2004.

SHIMASAKI, Y. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. **Journal American College of Cardiology**. v. 31, n. 7, p. 1506-10, 1998.

SONG, J. et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells. **Clinical Chemistry**. v. 49, n.; 6, p. 847-52, 2003.

SRIVASTAVA, K. et al. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. **Clinica Chimica Acta**. v. 387, n. 1-2, p. 80-3, 2008.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetic**. v. 73, n. 5, p. 1162-9, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetic**. v. 68, n. 4, p. 978-89, 2001.

STERN, A. H. A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. **Environmental Research**. v. 98, n. 1, p. 133-42, 2005.

STRIJDOM, H.; CHAMANE, N.; LOCHNER, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. **Cardiovascular Journal African**. v. 20, n. 5, p. 303-10, 2009.

TAMEMOTO, H.; ISHIKAWA, S. E.; KAWAKAMI, M. Association of the Glu298Asp polymorphism of the eNOS Gene with ischemic heart disease in Japanese diabetic subjects. **Diabetes Research Clinical Practice**. v. 80, n. 2, p. 275-9, 2008.

TANGUREK, B. et al. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. **Heart and Vessels.** v. 21, n. 5, p. 285-90, 2006.

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D. A.. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics.** v. 11, n. 8, p. 719-25, 2001.

THOMAS, G. D.; ZHANG, W.; VICTOR, R. G. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. **Jama.** v. 285, n. 16, p. 2055-7, 2001.

UWABO, J. et al. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. **American Journal of Hypertension**. v. 11, n. 1, p. 125-8, 1998.

VELDMAN, B. A. et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. **Journal of Hypertension**. v. 20, n. 10, p. 2023-7, 2002.

VIRTANEN, J. K. et al. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 18, n. 2, p. 75-85, 2007.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacology Reviews**. v. 39, n. 3, p. 163-96, 1987.

WANG, J.; DUDLEY, D.; WANG, X. L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 22, n. 5, p. 1-4, 2002.

WANG, X. et al. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.** v. 101, n. 31, p. 11477-82, 2004.

WANG, X. L. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. **Nature Medicine**. v. 2, n. 1, p. 41-5, 1996.

WANG, X. L. et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **FEBS Letter.** v. 471, n. 1, p. 45-50, 2000.

WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Molecular Genetics and Metabolism.** v. 70, n. 4, p. 241-51, 2000.

WHO. Environmental Health Criteria 101. Methylmercury. International Program on Chemical Safety. World Health Organization. 1990.

WOLFF, B. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu(298)-->Asp polymorphism, carotid atherosclerosis and intima-media thickness in a general population sample. **Clinical Science**. v. 109, n. 5, p. 475-81, 2005.

YANG, B. K. et al. Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. **Free Radical Research**. v. 37, n. 1, p. 1-10, 2003.

YEMISCI, M. et al. Protective role of 27bp repeat polymorphism in intron 4 of eNOS gene in lacunar infarction. **Free Radical Research**. v. 43, n. 3, p. 272-9, 2009.

YILMAZ, H. et al. Plasma soluble adhesion molecule levels in coronary artery ectasia. **Cardiology**. v. 105, n. 3, p. 176-81, 2006.

YOSHIMURA, M. et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. **Human Genetic**. v. 103, n. 1, p. 65-9, 1998.

YOSHIMURA, M. et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants. **Journal of Investigating Medicine**. v. 48, n. 5, p. 367-74, 2000.

ZHANG, M. X. et al. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. **Journal of Biology Chemistry**. v. 283, n. 21, p. 14685-93, 2008.

ZHAO, H.; PFEIFFER, R.; GAIL, M. H. Haplotype analysis in population genetics and association studies. **Pharmacogenomics**. v. 4, n. 2, p. 171-8, 2003.

ZHAO, Q. et al. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. **Chinese Medical Journal**. v. 119, n. 13, p. 1065-71, 2006.